

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-518253

(P2020-518253A)

(43) 公表日 令和2年6月25日(2020.6.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1H 1/00 (2006.01)	AO1H 1/00 ZNAA	2B030
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/09 110	4B064
C12P 19/34 (2006.01)	C12N 15/09 100	
AO1H 5/00 (2018.01)	C12P 19/34 A	
	AO1H 5/00 A	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-560164 (P2019-560164)
 (86) (22) 出願日 平成30年5月7日 (2018.5.7)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年12月11日 (2019.12.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2018/085829
 (87) 国際公開番号 WO2018/202199
 (87) 国際公開日 平成30年11月8日 (2018.11.8)
 (31) 優先権主張番号 201710778196.0
 (32) 優先日 平成29年9月1日 (2017.9.1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)
 (31) 優先権主張番号 62/502, 418
 (32) 優先日 平成29年5月5日 (2017.5.5)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 517253632
 インスティテュート・オブ・ジェネティクス・アンド・ディヴェロプメンタル・バイオロジー、チャイニーズ・アカデミー・オブ・サイエンシズ
 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences
 中華人民共和国 ペキン チャオヤン ウェスト ベイチェン ロード ナンバー1
 No. 1 West Beichen Road, Chaoyang, Beijing 100101, China

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニックマーカー配列を使用せず細胞を単離する方法

(57) 【要約】

表現型選択形質の平行導入と組み合わせられる、植物、植物細胞、または植物物質において標的化編集する方法。本方法は、トランスジェニック選択マーカー配列を導入するステップを含まない。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの改変植物細胞、または前記少なくとも 1 つの改変植物細胞を含む少なくとも 1 つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカー配列を安定的に組み込むことなく単離する方法であって、

a . 改変すべき少なくとも 1 つの植物細胞の第 1 の植物ゲノム標的部に、少なくとも 1 つの第 1 の標的化塩基修飾を導入することであって、前記少なくとも 1 つの標的化塩基修飾により、少なくとも 1 つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；

b . 前記改変すべき少なくとも 1 つの植物細胞の第 2 の植物ゲノム標的部に、少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾を導入することであって、前記少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾は、前記少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾を前記第 2 の植物ゲノム標的部に作成する少なくとも 1 つの部位特異的エフェクターを用いて導入され、前記少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾は、前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも 1 つの植物細胞に、または前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化修飾を含む少なくとも 1 つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物に導入されて、少なくとも 1 つの改変植物細胞を得る、導入すること；および

c .

i . 前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化塩基修飾により前記第 1 の植物ゲノム標的部にもたらされた前記少なくとも 1 つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに

i i . 前記第 2 の植物ゲノム標的部の前記少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾を選択することにより、

少なくとも 1 つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも 1 つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離することを含む、方法。

【請求項 2】

ステップ b が、前記少なくとも 1 つの第 2 の植物ゲノム標的部に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型を導入することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化修飾および前記少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾を含む少なくとも 1 つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得るステップであって、任意選択により、前記関心対象の遺伝子型は、前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化修飾を含んでいない、さらなるステップ d を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの部位特異的エフェクターが、少なくとも 1 つの塩基編集複合体に一時的または恒久的に結合しており、前記塩基編集複合体は、ステップ a の前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化塩基修飾を媒介する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの部位特異的エフェクターが、Cas もしくは Cpf1 ヌクレアーゼを含む CRISPR ヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノートヌクレアーゼ、FokI もしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼを含むヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または 2 部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、または塩基エディター、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも 1 つから選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの部位特異的エフェクターが、CRISPR ベースのヌクレアーゼであり、前記 CRISPR ベースのヌクレアーゼは、前記少なくとも 1 つの塩基編集複合体を導く部位特異的 DNA 結合ドメインを含み、前記少なくとも 1 つの CRISPR ベー

10

20

30

40

50

スのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、

- a . S p C a s 9、S a C a s 9、S a K K H - C a s 9、V Q R - C a s 9、S t 1 C a s 9を含む、C a s 9、
- b . A s C p f 1、L b C p f 1、F n C p f 1を含む、C p f 1、
- c . C a s X、および
- d . C a s Y、

ならびに前述したC R I S P Rベースのヌクレアーゼの任意のバリエーションおよび誘導体を含む群より選択され、好ましくは前記少なくとも1つのC R I S P Rベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたC R I S P Rベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的D N Aニッカーゼに、または全D N A切断能力を失ったD N A結合エフェクターに変換されている、請求項1記載の方法。

10

【請求項7】

前記少なくとも1つの第1の標的塩基修飾が、少なくとも1つの塩基エディターを構成要素として含む少なくとも1つの塩基編集複合体により作成される、請求項1記載の方法。

【請求項8】

前記塩基編集複合体が、少なくとも1つのシチジンデアミナーゼ、またはその触媒活性フラグメントを含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】

前記少なくとも1つの第1の標的塩基修飾が、ヌクレオチドC、A、T、またはGのいずれかの、任意のほかのヌクレオチドへの変換である、請求項7記載の方法。

20

【請求項10】

前記塩基編集複合体がA P O B E C 1構成要素を含む、請求項7記載の方法。

【請求項11】

前記塩基編集複合体がU G I構成要素を含み、かつ/または前記塩基編集複合体がX T E N構成要素を含む、請求項7記載の方法。

【請求項12】

前記塩基編集複合体がP m C D A 1構成要素を含む、請求項7記載の方法。

【請求項13】

前記少なくとも1つの塩基編集複合体が2つ以上の構成要素を含み、前記少なくとも2つの構成要素は物理的に結合している、請求項7記載の方法。

30

【請求項14】

前記少なくとも1つの塩基編集複合体が2つ以上の構成要素を含み、前記少なくとも2つの構成要素は単体の構成要素として与えられる、請求項7記載の方法。

【請求項15】

前記少なくとも1つの塩基編集複合体の少なくとも1つの構成要素が、前記少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けるために少なくとも1つの小器官局在化シグナルを含む、請求項7記載の方法。

【請求項16】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、核局在化シグナル(N L S)である、請求項15記載の方法。

40

【請求項17】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、葉緑体輸送ペプチドである、請求項15記載の方法。

【請求項18】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、ミトコンドリア輸送ペプチドである、請求項15記載の方法。

【請求項19】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位が、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、前記少なくとも1つの表現型選択形

50

質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する、請求項1記載の方法。

【請求項20】

前記関心対象の少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの内在性遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、あるいは前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、前記少なくとも1つの内在性遺伝子または前記少なくとも1つの導入遺伝子は、前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質に前記少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは前記少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速度、胚発生のブースターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される、請求項19記載の方法。

10

【請求項21】

前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位が、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むEPSPS阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むALSまたはHAS阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリアルオキシフェノキシプロピオネート(FOP)を含むACCase阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド生合成阻害剤、4-ヒドロキシフェニル-ピルピン酸-ジオキシゲナーゼ(HPD)阻害剤、またはほかのカロテノイド生合成標的の阻害剤を含むカロテノイド生合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系I電子ダイバーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系II阻害剤に対する抵抗性/耐性、PPO阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンパ(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシシンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される、請求項19記載の方法。

20

30

【請求項22】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、植物毒抵抗性/耐性形質、好ましくは除草剤抵抗性/耐性形質であり、前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、植物毒化合物、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性を付与し、前記化合物は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体、またはその子孫に加えられる外来性化合物である、請求項19記載の方法。

【請求項23】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位がALSである、請求項19記載の方法。

40

【請求項24】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位がPPOである、請求項19記載の方法。

【請求項25】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位がEPSPS、ALS、またはPPOであり、前記EPSPS、ALS、またはPPOは、少なくとも1つの対応するアミノ酸変換をもたらす少なくとも1つの核酸変換を含み、前記少なくとも1つの核酸変換は、少なくとも1つの塩基エディターにより作成される、請求項19記載の方法

50

。

【請求項 26】

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて A 1 2 2 をコードする配列に生じる、請求項 23 記載の方法。

【請求項 27】

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて P 1 9 7 をコードする配列に生じる、請求項 23 記載の方法。

【請求項 28】

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて A 2 0 5 をコードする配列に生じる、請求項 23 記載の方法。

10

【請求項 29】

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて D 3 7 6 をコードする配列に生じる、請求項 23 記載の方法。

【請求項 30】

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて R 3 7 7 をコードする配列に生じる、請求項 23 記載の方法。

【請求項 31】

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて W 5 7 4 をコードする配列に生じる、請求項 23 記載の方法。

【請求項 32】

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて S 6 5 3 をコードする配列に生じる、請求項 23 記載の方法。

20

【請求項 33】

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて G 6 5 4 をコードする配列に生じる、請求項 23 記載の方法。

【請求項 34】

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて C 2 1 5 をコードする配列に生じる、請求項 24 記載の方法。

【請求項 35】

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて A 2 2 0 をコードする配列に生じる、請求項 24 記載の方法。

30

【請求項 36】

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて G 2 2 1 をコードする配列に生じる、請求項 24 記載の方法。

【請求項 37】

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて N 4 2 5 をコードする配列に生じる、請求項 24 記載の方法。

【請求項 38】

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて Y 4 2 6 をコードする配列または I 4 7 5 をコードする配列に生じる、請求項 24 記載の方法。

40

【請求項 39】

標的化修飾が、配列番号 27 の E P S P S 基準配列と比べて G 1 0 1 および G 1 4 4 をコードする配列に生じる、請求項 25 記載の方法。

【請求項 40】

標的化修飾が、配列番号 27 の E P S P S 基準配列と比べて G 1 0 1 および A 1 9 2 をコードする配列に生じる、請求項 25 記載の方法。

【請求項 41】

標的化修飾が、配列番号 27 の E P S P S 基準配列と比べて T 1 0 2 および P 1 0 6 をコードする配列に生じる、請求項 25 記載の方法。

【請求項 42】

50

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体の特定または単離に便利な可視表現型である、請求項1記載の方法。

【請求項43】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が光沢表現型である、請求項42記載の方法。

【請求項44】

前記少なくとも1つの表現型選択形質がゴールデン表現型である、請求項42記載の方法。

【請求項45】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が着色表現型または成長優位性表現型である、請求項42記載の方法。

【請求項46】

前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞が、好ましくはホルデウム・ウルガレ (*Hordeum vulgare*)、ホルデウム・バルバゾム (*Hordeum bulbosum*)、ソルガム・ビコロ (*Sorghum bicolor*)、サッカラム・オフィシナリウム (*Saccharum officinarium*)、ゼア・メイズ (*Zea mays*) などのゼア (*Zea*) spp.、セタリア・イタリカ (*Setaria italica*)、オリザ・ミヌタ (*Oryza minuta*)、オリザ・サチワ (*Oryza sativa*)、オリザ・アウストラリエンシス (*Oryza australiensis*)、オリザ・アルタ (*Oryza alta*)、トリチカム・アエスチウム (*Triticum aestivum*)、トリチカム・デュラム (*Triticum durum*)、セカレ・ケレアレ (*Secale cereale*)、トリチカレ (*Triticale*)、マルス・ドメスチカ (*Malus domestica*)、ブラキボジウム・ジスタキオン (*Brachypodium distachyon*)、ホルデウム・マリナム (*Hordeum marinum*)、アエギロプス・タウスキイ (*Aegilops tauschii*)、ダウカス・グロキジアタス (*Daucus glaucoides*)、ベタ・ウルガリス (*Beta vulgaris*) などのベタ (*Beta*) spp.、ダウカス・プシルス (*Daucus pusillus*)、ダウカス・ムリカタス (*Daucus muricatus*)、ダウカス・カロタ (*Daucus carota*)、ユーカリプタス・グランジス (*Eucalyptus grandis*)、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・トメントシホルミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・ベンタミアナ (*Nicotiana glauca*)、ソラナム・リコベルシカム (*Solanum lycopersicum*)、ソラナム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、コフエア・カネフォラ (*Coffea canephora*)、ウイティス・ウイニフェラ (*Vitis vinifera*)、エリトランテ・グッタータ (*Erythraea guttata*)、ゲンリセア・アウレア (*Genlisea aurea*)、ククミス・サチウス (*Cucumis sativus*)、マルス・ノタビリス (*Marus notabilis*)、アラビドプシス・アレノサ (*Arabidopsis arenosa*)、アラビドプシス・リラタ (*Arabidopsis lyrata*)、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ (*Crucihimalaya himalayica*)、クルキヒマラヤ・ワリキイ (*Crucihimalaya wallichii*)、カルダミネ・ネクスオサ (*Cardamine nexuosa*)、レピジウム・ウイルギニカム (*Lepidium virginicum*)、カプセラ・ブルサ・パストリス (*Capsella bursa pastoris*)、オルマラビドプシス・プミラ (*Olmarabidopsis pumila*)、アラビス・ヒルステ (*Arabis hirsute*)、ブラシカ・ナプス (*Brassica napus*)、ブラシカ・オレラケア (*Brassica oleracea*)、ブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*)、ラファヌス・サチウス (*Raphanus sativus*)、ブ

10

20

30

40

50

ラシカ・ユンカケア (*Brassica juncea*)、ブラシカ・ニグラ (*Brassica nigra*)、エルカ・ウエシカリア *subsp.* サチワ (*Eruca vesicaria subsp. sativa*)、シトラス・シネンシス (*Citrus sinensis*)、ジャトロファ・クルカス (*Jatropha curcas*)、ポプラス・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*)、メジカゴ・トランカツラ (*Medicago truncatula*)、キケル・ヤマシタエ (*Cicer yamashitae*)、キケル・ビユガム (*Cicer bijugum*)、キケル・アリエチナム (*Cicer arietinum*)、キケル・レチクラタム (*Cicer reticulatum*)、キケル・ユダイカム (*Cicer judaicum*)、カヤナス・カヤニフォリウス (*Cajanus cajanifolius*)、カヤナス・スカラバエオイデス (*Cajanus scarabaeoides*)、ファセオラス・ウルガリス (*Phaseolus vulgaris*)、グリキネ・マクス (*Glycine max*)、ゴシピウム (*Gossypium*) *sp.*、アストラガラス・シニカス (*Astragalus sinicus*)、ロータス・ヤポニカス (*Lotus japonicas*)、トレニア・フォウルニエリ (*Torenia fournieri*)、アリウム・ケパ (*Allium cepa*)、アリウム・フィスツロサム (*Allium fistulosum*)、アリウム・サチウム (*Allium sativum*)、ヘリアンタス・アヌウス (*Helianthus annuus*)、ヘリアンタス・ツベロサス (*Helianthus tuberosus*)、およびアリウム・ツベロサム (*Allium tuberosum*) からなる群より選択される植物または前述の植物の1つに属するあらゆる変種もしくは亜種に由来する、請求項1記載の方法。

【請求項47】

少なくとも1つの改変植物細胞、または前記少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカール配列を安定的に組み込むことなく単離する方法であって、

a. 改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部に、ヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、またはDNA修飾試薬を含む少なくとも1つの第1の部位特異的エフェクターを用いて、少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾を導入することであって、前記少なくとも1つの標的化コドン欠失修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；

b. 前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾は、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を前記第2の植物ゲノム標的部に作成する少なくとも1つの第2の部位特異的エフェクターを用いて導入され、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾は、前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、または前記少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および

c.

i. 前記少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾により前記第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた前記少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに

ii. 前記第2の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、

少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、

d. 任意選択により、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾および前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得ることであって、任意選択により、前記関心対象の遺

10

20

30

40

50

伝子型は、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、交配させること、を含む、方法。

【請求項48】

好ましくはステップbが、前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位および/または前記少なくとも第2の植物ゲノム標的部位に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型を導入することをさらに含む、請求項47記載の方法。

【請求項49】

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CasもしくはCpf1ヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノートヌクレアーゼ、FokIもしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または2部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも1つから選択される、請求項47記載の方法。

10

【請求項50】

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CRISPRベースのヌクレアーゼであり、前記CRISPRベースのヌクレアーゼは、部位特異的DNA結合ドメインを含み、前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、

a. SpCas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、VQR-Cas9、St1Cas9を含む、Cas9、

20

b. AscP1、LbCpf1、FnCpf1を含む、Cpf1、

c. CasX、および

d. CasY、

ならびに前述したCRISPRベースのヌクレアーゼの任意のバリエーションおよび誘導体を含む群より選択され、任意選択により前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたCRISPRベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的DNAニッカーゼに、または全DNA切断能力を失ったDNA結合エフェクターに変換されている、請求項47記載の方法。

【請求項51】

前記少なくとも部位特異的エフェクター、または前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターを含む複合体の少なくとも1つの構成要素が、前記少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けるために少なくとも1つの小器官局在化シグナルを含む、請求項47記載の方法。

30

【請求項52】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、核局在化シグナル(NLS)である、請求項51記載の方法。

【請求項53】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、葉緑体輸送ペプチドである、請求項51記載の方法。

【請求項54】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、ミトコンドリア輸送ペプチドである、請求項51記載の方法。

40

【請求項55】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位が、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、前記少なくとも1つの表現型選択形質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する、請求項47記載の方法。

50

【請求項 5 6】

前記関心対象の少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの内在性遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、あるいは前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、前記少なくとも1つの内在性遺伝子または前記少なくとも1つの導入遺伝子は、前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質に前記少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは前記少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速度、胚発生のプースターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される、請求項 4 7 記載の方法。

10

【請求項 5 7】

前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位が、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むE P S P S 阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むA L S またはA H A S 阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリアルオキシフェノキシプロピオネート(F O P)を含むA C C a s e 阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド生合成阻害剤、4 - ヒドロキシフェニル - ビルビン酸 - ジオキシゲナーゼ(H P P D) 阻害剤、またはほかのカロテノイド生合成標的の阻害剤を含むカロテノイド生合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系 I 電子ダイバーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系 I I 阻害剤に対する抵抗性/耐性、P P O 阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンバ(2, 4 - ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシシンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される、請求項 4 7 記載の方法。

20

【請求項 5 8】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、植物毒抵抗性/耐性形質、好ましくは除草剤抵抗性/耐性形質であり、前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾は、植物毒化合物、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性を付与し、前記化合物は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体、またはその子孫に加えられる外来性化合物である、請求項 4 7 記載の方法。

30

【請求項 5 9】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位が、選択の目的で、アマランサス・ツベルクラタス(Amaranthus tuberculatus)のP P X 2 L 遺伝子産物のホモログである、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 0】

前記少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾が、配列番号 2 8 のアマランサス・ツベルクラタス(Amaranthus tuberculatus)のP P X 2 L 遺伝子産物のG 2 1 0 残基に相当する位置に生じる、請求項 5 9 記載の方法。

40

【請求項 6 1】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体の特定または単離に便利な可視表現型である、請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 6 2】

前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞が、好ましくはホルデウム・ウルガレ(Hordeum vulgare)、ホルデウム・バルバゾム(Hordeum bulbosum)、ソルガム・ビコロ(Sorghum bicolor)、サッカラム・オフィシナリウム(Saccharum officinarium)、ゼア・メイズ(Zea

50

mays) などのゼア (*Zea*) spp.、セタリア・イタリカ (*Setaria italica*)、オリザ・ミヌタ (*Oryza minuta*)、オリザ・サチワ (*Oryza sativa*)、オリザ・アウストラリエンシス (*Oryza australiensis*)、オリザ・アルタ (*Oryza alta*)、トリチカム・アエスチウム (*Triticum aestivum*)、トリチカム・デュラム (*Triticum durum*)、セカレ・ケレアレ (*Secale cereale*)、トリチカレ (*Triticale*)、マルス・ドメスチカ (*Malus domestica*)、ブラキボジウム・ジスタキオン (*Brachypodium distachyon*)、ホルデウム・マリナム (*Hordeum marinum*)、アエギロプス・タウスキイ (*Aegilops tauschii*)、ダウカス・グロキジアタス (*Daucus glochidiatus*)、ベタ・ウルガリス (*Beta vulgaris*) などのベタ (*Beta*) spp.、ダウカス・プシルス (*Daucus pusillus*)、ダウカス・ムリカタス (*Daucus muricatus*)、ダウカス・カロタ (*Daucus carota*)、ユーカリプタス・グランジス (*Eucalyptus grandis*)、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ・トメントシホルミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ・ベンタミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*)、ソラナム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、コフェア・カネフォラ (*Coffea canephora*)、ウイティス・ウニフェラ (*Vitis vinifera*)、エリトランテ・グッタータ (*Erythraea guttata*)、ゲンリセア・アウレア (*Genlisea aurea*)、ククミス・サチウス (*Cucumis sativus*)、マルス・ノタビリス (*Marus notabilis*)、アラビドプシス・アレノサ (*Arabidopsis arenosa*)、アラビドプシス・リラタ (*Arabidopsis lyrata*)、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ (*Crucihimalaya himalayica*)、クルキヒマラヤ・ワリキイ (*Crucihimalaya walliichii*)、カルダミネ・ネクソオサ (*Cardamine nexuosa*)、レビジウム・ウイルギニカム (*Lepidium virginicum*)、カプセラ・ブルサ・パストリス (*Capsella bursa pastoris*)、オルマラビドプシス・プミラ (*Olmarabidopsis pumila*)、アラビス・ヒルステ (*Arabis hirsute*)、ブラシカ・ナプス (*Brassica napus*)、ブラシカ・オレラケア (*Brassica oleracea*)、ブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*)、ラファヌス・サチウス (*Raphanus sativus*)、ブラシカ・ユンカケア (*Brassica juncacea*)、ブラシカ・ニグラ (*Brassica nigra*)、エルカ・ウエシカリア subsp. サチワ (*Eruca vesicaria subsp. sativa*)、シトラス・シネンシス (*Citrus sinensis*)、ジャトロファ・クルカス (*Jatropha curcas*)、ポプラス・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*)、メジカゴ・トランカツラ (*Medicago truncatula*)、キケル・ヤマシタエ (*Cicer yamashitae*)、キケル・ビュガム (*Cicer bijugum*)、キケル・アリエチナム (*Cicer arietinum*)、キケル・レチクラタム (*Cicer reticulatum*)、キケル・ユダイカム (*Cicer judaicum*)、カヤナス・カヤニフォリウス (*Cajanus cajanifolius*)、カヤナス・スカラバエオイデス (*Cajanus scarabaeoides*)、ファセオラス・ウルガリス (*Phaseolus vulgaris*)、グリキネ・マクス (*Glycine max*)、ゴシピウム (*Gossypium*) sp.、アストラガラス・シニカス (*Astragalus sinicus*)、ロータス・ヤボニカス (*Lotus japonicas*)、トレニア・フォウルニエリ (*Torenia fourn*

10

20

30

40

50

ier i)、アリウム・ケパ (Allium cepa)、アリウム・フィストロサム (Allium fistulosum)、アリウム・サチウム (Allium sativum)、ヘリアンタス・アヌウス (Helianthus annuus)、ヘリアンタス・ツベロサス (Helianthus tuberosus)、およびアリウム・ツベロサム (Allium tuberosum) からなる群より選択される植物または前述の植物の1つに属するあらゆる変種もしくは亜種に由来する、請求項47記載の方法。

【請求項63】

少なくとも1つの改変植物細胞、または前記少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカ

10

a. 改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部に、少なくとも1つの第1の部位特異的エフェクターを用いて、少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾を導入することであって、前記少なくとも1つの標的化フレームシフトまたは欠失修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；

b. 前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾は、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を前記第2の植物ゲノム標的部に作成するヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、またはDNA修飾試薬を含む少なくとも1つの第2の部位特異的エフェクターを用いて導入され、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾

20

c. i. 前記少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾により前記第1の植物ゲノム標的部にもたらされた前記少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに

ii. 前記第2の植物ゲノム標的部の前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、

30

少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、

d. 任意選択により、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾および前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得ることであって、任意選択により、前記関心対象の遺伝子型は、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、交配させることを含む、方法。

【請求項64】

好ましくはステップbが、前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部および/または前記少なくとも1つの第2の植物ゲノム標的部に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型を導入することをさらに含む、請求項63記載の方法。

40

【請求項65】

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CasもしくはCpf1ヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノートヌクレアーゼ、FokIもしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または2部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも1つから選択される、請求項63記載の方法。

【請求項66】

50

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CRISPRベースのヌクレアーゼであり、前記CRISPRベースのヌクレアーゼは、部位特異的DNA結合ドメインを含み、前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、

- a. SpCas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、VQR-Cas9、St1Cas9を含む、Cas9、
- b. Ascpf1、LbCpf1、FnCpf1を含む、Cpf1、
- c. CasX、および
- d. CasY、

ならびに前述したCRISPRベースのヌクレアーゼの任意のバリエーションおよび誘導体を含む群より選択され、任意選択により前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたCRISPRベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的DNAニッカーゼに、または全DNA切断能力を失ったDNA結合エフェクターに変換されている、請求項63記載の方法。

【請求項67】

前記少なくとも部位特異的エフェクター、または前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターを含む複合体の少なくとも1つの構成要素が、前記少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けてのために少なくとも1つの小器官局在化シグナルを含む、請求項63記載の方法。

【請求項68】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、核局在化シグナル(NLS)である、請求項67記載の方法。

【請求項69】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、葉緑体輸送ペプチドである、請求項67記載の方法。

【請求項70】

前記少なくとも1つの小器官局在化シグナルが、ミトコンドリア輸送ペプチドである、請求項67記載の方法。

【請求項71】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位が、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、前記少なくとも1つの表現型選択形質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する、請求項63記載の方法。

【請求項72】

前記関心対象の少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの内在性遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、あるいは前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、前記少なくとも1つの内在性遺伝子または前記少なくとも1つの導入遺伝子は、前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質に前記少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは前記少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速度、胚発生のブースターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される、請求項63記載の方法。

【請求項73】

前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位が、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝

10

20

30

40

50

子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むE P S P S阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むA L SまたはA H A S阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリアルオキシフェノキシプロピオネート(F O P)を含むA C C a s e阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド生合成阻害剤、4-ヒドロキシフェニル-ピルビン酸-ジオキシゲナーゼ(H P P D)阻害剤、またはほかのカロテノイド生合成標的の阻害剤を含むカロテノイド生合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系I電子ダイバーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系II阻害剤に対する抵抗性/耐性、P P O阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンパ(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシシンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される、請求項63記載の方法。

10

【請求項74】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、植物毒抵抗性/耐性形質、好ましくは除草剤抵抗性/耐性形質であり、前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾は、植物毒化合物、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性を付与し、前記化合物は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体、またはその子孫に加えられる外来性化合物である、請求項63記載の方法。

20

【請求項75】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体の特定または単離に便利な可視表現型である、請求項63記載の方法。

【請求項76】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が光沢表現型である、請求項75記載の方法。

【請求項77】

前記少なくとも1つの表現型選択形質がゴールデン表現型である、請求項75記載の方法。

【請求項78】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が着色表現型である、請求項75記載の方法。

30

【請求項79】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が成長優位性表現型である、請求項75記載の方法。

【請求項80】

前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞が、好ましくはホルデウム・ウルガレ(*Hordeum vulgare*)、ホルデウム・バルバゾム(*Hordeum bulbosum*)、ソルガム・ビコロ(*Sorghum bicolor*)、サッカラム・オフィシナリウム(*Saccharum officinarium*)、ゼア・メイズ(*Zea mays*)などのゼア(*Zea*) spp.、セタリア・イタリカ(*Setaria italica*)、オリザ・ミヌタ(*Oryza minuta*)、オリザ・サチワ(*Oryza sativa*)、オリザ・アウストラリエンシス(*Oryza australiensis*)、オリザ・アルタ(*Oryza alta*)、トリチカム・アエストウム(*Triticum aestivum*)、トリチカム・デュラム(*Triticum durum*)、セカレ・ケレアレ(*Secale cereale*)、トリチカレ(*Triticale*)、マルス・ドメスチカ(*Malus domestica*)、ブラキポジウム・ジスタキオン(*Brachypodium distachyon*)、ホルデウム・マリナム(*Hordeum marinum*)、アエギロプス・タウスキイ(*Aegilops tauschii*)、ダウカス・グロキジアタス(*Daucus glaucoidiatus*)、ベタ・ウルガリス(*Beta vulgaris*)などのベタ(*Beta*) spp.、ダウカス・プシルス(*Daucus pusillus*)、ダウカス

40

50

・ムリカサス (*Daucus muricatus*)、ダウカス・カロタ (*Daucus carota*)、ユーカリプタス・グランジス (*Eucalyptus grandis*)、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ・トメントシホルミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ・ベントミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*)、ソラナム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、コフェア・カネフォラ (*Coffea canephora*)、ウイティス・ウニフェラ (*Vitis vinifera*)、エリトランテ・グッタータ (*Erythraea guttata*)、ゲンリセア・アウレア (*Genlisea aurea*)、ククミス・サチウス (*Cucumis sativus*)、マルス・ノタビリス (*Marus notabilis*)、アラビドプシス・アレノサ (*Arabidopsis arenosa*)、アラビドプシス・リラタ (*Arabidopsis lyrata*)、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ (*Crucihimalaya himalaica*)、クルキヒマラヤ・ワリキイ (*Crucihimalaya wallichii*)、カルダミネ・ネクスオサ (*Cardamine nexuosa*)、レビジウム・ウイルギニカム (*Lepidium virginicum*)、カプセラ・ブルサ・パストリス (*Capsella bursa pastoris*)、オルマラビドプシス・プミラ (*Olmaraabidopsis pumila*)、アラビス・ヒルステ (*Arabis hirsute*)、ブラシカ・ナプス (*Brassica napus*)、ブラシカ・オレラケア (*Brassica oleracea*)、ブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*)、ラファヌス・サチウス (*Raphanus sativus*)、ブラシカ・ユンカケア (*Brassica juncacea*)、ブラシカ・ニグラ (*Brassica nigra*)、エルカ・ウエシカリア subsp. サチワ (*Eruca vesicaria subsp. sativa*)、シトラス・シネンシス (*Citrus sinensis*)、ジャトロファ・クルカス (*Jatropha curcas*)、ポプラス・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*)、メジカゴ・トランカツラ (*Medicago truncatula*)、キケル・ヤマシタエ (*Cicer yamashitae*)、キケル・ビュガム (*Cicer bijugum*)、キケル・アリエチナム (*Cicer arietinum*)、キケル・レチクラタム (*Cicer reticulatum*)、キケル・ユダイカム (*Cicer judaicum*)、カヤナス・カヤニフォリウス (*Cajanus cajanifolius*)、カヤナス・スカラバエオイデス (*Cajanus scarabaeoides*)、ファセオラス・ウルガリス (*Phaseolus vulgaris*)、グリキネ・マクス (*Glycine max*)、ゴシビウム (*Gossypium*) sp.、アストラガラス・シニカス (*Astragalus sinicus*)、ロータス・ヤポニカス (*Lotus japonicas*)、トレニア・フォウルニエリ (*Torenia fourrieri*)、アリウム・ケパ (*Allium cepa*)、アリウム・フィスツロサム (*Allium fistulosum*)、アリウム・サチウム (*Allium sativum*)、ヘリアンタス・アヌウス (*Helianthus annuus*)、ヘリアンタス・ツベロサ (*Helianthus tuberosus*)、およびアリウム・ツベロサム (*Allium tuberosum*) からなる群より選択される植物または前述の植物の1つに属するあらゆる変種もしくは亜種に由来する、請求項63記載の方法。

【請求項81】

請求項1記載の方法により得ることができる、植物細胞、組織、器官、物質、もしくは植物体、またはその子孫。

【請求項82】

請求項47記載の方法により得ることができる、植物細胞、組織、器官、物質、もしくは植物体、またはその子孫。

10

20

30

40

50

【請求項 83】

請求項 63 記載の方法により得ることができる、植物細胞、組織、器官、物質、もしくは植物体、またはその子孫。

【請求項 84】

ゲノム編集により遺伝子改変植物を作製する方法であって、

a) 遺伝子改変すべき植物の細胞または組織を準備するステップ；

b) 第1のゲノム編集系および第2のゲノム編集系を準備するステップであって、前記第1のゲノム編集系は、植物の選択マーカー遺伝子を標的化し修飾することができ、前記第2のゲノム編集系は、前記植物の関心対象の遺伝子を標的化し修飾することができる、ステップ；

c) 前記第1および前記第2のゲノム編集系で前記細胞または前記組織を同時形質転換するステップ；

d) 好ましくは選択圧なしで、前記形質転換細胞または組織から植物を再生させるステップ；

e) ステップ d) で再生させた植物のなかから、前記選択マーカー遺伝子が修飾されている植物を選択するステップ；および

f) ステップ e) で選択した植物のなかから、その標的遺伝子が修飾されている植物を特定するステップを含む、方法。

【請求項 85】

前記ゲノム編集系が、精密塩基エディター (PBE) 系、CRISPR-Cas9系、CRISPR-Cpf1系、CRISPRi系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系、およびTALEN系から選択される、請求項 84 記載の方法。

【請求項 86】

前記選択マーカー遺伝子の修飾により、前記植物に選択可能な形質が生じ、好ましくは前記選択マーカー遺伝子の前記修飾は、前記植物のほかの形質を変えることがない、請求項 84 記載の方法。

【請求項 87】

前記選択形質が除草剤抵抗性である、請求項 86 記載の方法。

【請求項 88】

前記選択マーカー遺伝子が、sbA、ALS、EPSPS、ACCase、PPO、HPPD、PDS、GS、DOXP5、およびP450からなる群より選択される、請求項 87 記載の方法。

【請求項 89】

前記選択形質が、葉舌、葉色、葉蛾などの目視観測できる形質である、請求項 86 記載の方法。

【請求項 90】

前記選択マーカー遺伝子が、LIG、PDS、zb7、およびGL2からなる群より選択される、請求項 87 記載の方法。

【請求項 91】

前記第1のゲノム編集系および前記第2のゲノム編集系が、精密塩基エディター (PBE) 系である、請求項 84 から 90 までのいずれか1項記載の方法。

【請求項 92】

前記植物が、好ましくはホルデウム・ウルガレ (Hordeum vulgare)、ホルデウム・バルバゾム (Hordeum bulbosum)、ソルガム・ビコロ (Sorghum bicolor)、サッカルム・オフィシナリウム (Saccharum officinarium)、ゼア・メイズ (Zea mays) などのゼア (Zea) spp.、セタリア・イタリカ (Setaria italica)、オリザ・ミヌタ (Oryza minuta)、オリザ・サチワ (Oryza sativa)、オリザ・アウストラリエンシス (Oryza australiensis)、オリザ・アルタ

10

20

30

40

50

(*Oryza alta*)、トリチカム・アエスチウム (*Triticum aestivum*)、トリチカム・デュラム (*Triticum durum*)、セカレ・ケレアレ (*Secale cereale*)、トリチカレ (*Triticale*)、マルス・ドメスチカ (*Malus domestica*)、ブラキポジウム・ジスタキオン (*Brachypodium distachyon*)、ホルデウム・マリナム (*Hordeum marinum*)、アエギロプス・タウスキイ (*Aegilops tauschii*)、ダウカス・グロキジアタス (*Daucus glochidiatus*)、ベタ・ウルガリス (*Beta vulgaris*) などのベタ (*Beta*) spp.、ダウカス・プシルス (*Daucus pusillus*)、ダウカス・ムリカタス (*Daucus muricatus*)、ダウカス・カロタ (*Daucus carota*)、ユーカリプタス・グランジス (*Eucalyptus grandis*)、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ・トメントシホルミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ・ベンタミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*)、ソラナム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、コフェア・カネフォラ (*Coffea canephora*)、ウイティス・ウイニフェラ (*Vitis vinifera*)、エリトランテ・グッタータ (*Erythraea guttata*)、ゲンリセア・アウレア (*Genlisea aurea*)、ククミス・サチウス (*Cucumis sativus*)、マルス・ノタビリス (*Marus notabilis*)、アラビドプシス・アレノサ (*Arabidopsis arenosa*)、アラビドプシス・リラタ (*Arabidopsis lyrata*)、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ (*Crucihimalaya himalaica*)、クルキヒマラヤ・ワリキイ (*Crucihimalaya wallichii*)、カルダミネ・ネクソオサ (*Cardamine nexuosa*)、レピジウム・ウイルギニカム (*Lepidium virginicum*)、カプセラ・ブルサ・パストリス (*Capsella bursa pastoris*)、オルマラビドプシス・プミラ (*Olmaraabidopsis pumila*)、アラビス・ヒルステ (*Arabis hirsute*)、ブラシカ・ナプス (*Brassica napus*)、ブラシカ・オレラケア (*Brassica oleracea*)、ブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*)、ラファヌス・サチウス (*Raphanus sativus*)、ブラシカ・ユンカケア (*Brassica juncea*)、ブラシカ・ニグラ (*Brassica nigra*)、エルカ・ウエシカリア subsp. サチワ (*Eruca vesicaria subsp. sativa*)、シトラス・シネンシス (*Citrus sinensis*)、ジャトロファ・クルカス (*Jatropha curcas*)、ポプラス・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*)、メジカゴ・トランカツラ (*Medicago truncatula*)、キケル・ヤマシタエ (*Cicer yamashitae*)、キケル・ビュガム (*Cicer bijugum*)、キケル・アリエチナム (*Cicer arietinum*)、キケル・レチクラタム (*Cicer reticulatum*)、キケル・ユダイカム (*Cicer judaicum*)、カヤナス・カヤニフォリウス (*Cajanus cajanifolius*)、カヤナス・スカラバエオイデス (*Cajanus scarabaeoides*)、ファセオラス・ウルガリス (*Phaseolus vulgaris*)、グリキネ・マクス (*Glycine max*)、ゴシピウム (*Gossypium*) sp.、アストラガラス・シニカス (*Astragalus sinicus*)、ロータス・ヤポニカス (*Lotus japonicas*)、トレニア・フォーウルニエリ (*Torenia fourrieri*)、アリウム・ケパ (*Allium cepa*)、アリウム・フィスツロサム (*Allium fistulosum*)、アリウム・サチウム (*Allium sativum*)、ヘリアンタス・アヌウス (*Helianthus annuus*)、ヘリアンタス・ツベロサス (*Helian*

10

20

30

40

50

thus tuberosus)、およびアリウム・ツベロサム (Allium tuberosum) からなる群より選択される植物または前述の植物の1つに属するあらゆる変種もしくは亜種である、請求項84から91までのいずれか1項記載の方法。

【請求項93】

請求項84の方法により得ることができる遺伝子改変植物であって、好ましくは導入遺伝子を含まない、遺伝子改変植物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、表現型選択形質の平行導入と組み合わせられる、植物、植物の細胞または物質における標的化編集の方法に関する。さらに、トランスジェニック選択マーカール配列を導入するステップを含まない方法を提供する。方法は、第1のゲノム標的部位に標的化修飾を導入して選択表現型を得ることを含み、外来性ポリヌクレオチド鋳型の提供には頼らず、標的部位の二本鎖切断の導入にも頼らない。最後に、本発明は、異なるゲノム標的部位におけるトランスジェニックマーカールを用いない選択と標的化編集とを平行化する、特定の方法ステップの組み合わせに関し、その結果として選択可能なまたはほかの表現型を付与して、選択マーカールカセットを用いない植物物質の単離を可能にし、それによって関心対象の遺伝子型を特定する選択の手間が大幅に縮小された精密育種を可能にする。

10

【0002】

発明の背景

真核細胞の遺伝情報の精密な改変は、農業、薬学、および医学用途にとって高い価値があるが、基礎研究にとっても重要である。ゲノム工学またはゲノム編集とは、そのような定められた遺伝子変化を高精度で標的中に作成する能力のことである。たとえば、標的化部位特異的ヌクレアーゼ (SSN) またはリコンビナーゼにより、真核細胞中に二本鎖切断を生じさせることができる。

20

【0003】

植物では、精密二本鎖切断が起きることで、相同組換え (HR) 事象の頻度が100~1000倍増加する (Puchta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (米) 1996, 93: 5055-5060)。しかし、改変細胞および改変植物の下流での特定が、植物改良用の育種ツールとしての遺伝子編集のルーチンな実施を制限している。

30

【0004】

植物の育種、および農薬などの農業技術の開発は、100年以上かけて目覚ましい進歩を遂げ、作物の収量を増加させてきた。しかし植物育種家たちは、常に多くの変化に応えていかねばならない。農業の慣行も変わるため、特定の農学的特徴を担持する遺伝子型をもつ植物を開発する必要性が生じる。さらに、標的環境とそこに生息する生物たちも変化し続けている。たとえば、真菌や害虫が絶えず発生しては、関心対象の植物の抵抗性に打ち勝ってしまう。新しい土地が次々に農業に使用され、植物は異なる生育条件にさらされる。そして、消費者の好みや要求も変わる。したがって、植物育種家たちは、絶えず作物の新品種を開発するという終わりのない課題に直面している (Collard and Mackill, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2008年2月12日; 363(1491): 557-572)。

40

【0005】

したがって、育種ストラテジーを支援するために、関心対象の遺伝子型を確実に決定できる診断能力のある選択マーカール配列またはマーカール支援選択 (MAS) ストラテジーが必要とされている。欧州特許登録第2 342 337号B1で開示されているように、診断マーカールの開発は、関心対象の形質の根底である遺伝子の遺伝学的位置のマッピングから始まり、両側のマーカールの特定、密接に結合したマーカールの特定による細密な遺伝子マッピング、最多結合マーカールのDNAマーカール配列の決定、標的遺伝子の位置特定に用

50

いられる親系統間のマーカー座位での配列多様性の決定、簡単なPCRアッセイの開発、植物物質の遺伝的背景（生殖質）の予測値の試験における選抜または育種中に診断特性をもつマーカーを試験する、といったプロセスを辿る。関心対象のマーカーが関心対象のゲノム内で好適な位置に存在するか挿入されなくてはならないので、前述のストラテジーは本質的に労力を要し、したがってコスト集約型となる。

【0006】

DNAマーカー技術は、表現型形質を決定するかわりに、検定しやすいマーカーに基づいた選択を可能にすることで、植物育種の効率を劇的に高めることができる。しかし、そのような診断または選抜特性をもつマーカーの開発、およびそうしたマーカーを用いる有効性は、上記で詳述したように、労力と時間のかかるプロセスであることが多い。現在、点変異、たとえばSNPを検出する方法では、そのような点変異をほんの少数しか特定できず、レポートリーも少ししか検出できない（Slade et al., Nat. Biotech. 23, 75-81）。

10

【0007】

とはいえ、選択マーカー遺伝子は、トランスジェニックおよびトランスプラストミック植物の研究、または作物開発で、植物において重要な役割を果たす。選択マーカー遺伝子は、レポーター遺伝子と組み合わせて使用されることが多く、該レポーター遺伝子は細胞に選択性の利点を与えないが、トランスジェニック事象を観察すること、またはトランスジェニック物質を非形質転換物質から手で分離することに用いることができる。

20

【0008】

急進しているのが、選択マーカー遺伝子を排除して、マーカーを含まない植物を作るストラテジーの開発分野である。マーカーを含まない植物を作ることの合理性については、いくつかの論評で詳しく論じられている（Yoder and Goldsbrough, 1994; Ow, 2001; Hare and Chua, 2002）。トランスジェニックおよび非トランスジェニック植物の製品化に関しては、最終植物品種において何の目的も果たさない遺伝子配列を除去することで、法的プロセスが簡単になり、消費者にも受け入れられやすくなる。最終植物からマーカー遺伝子を排除することで、膨大なバイオセーフティー審査を受けていない、あるいは植物に負の多面的効果を生じ得る実験的マーカー遺伝子の使用が可能になる。さらに、有用なマーカー遺伝子が次ラウンドの形質転換の前に排除されるならば、それを再利用して、トランスジェニック植物の反復的な形質転換が可能になる。

30

【0009】

このように、トランスジェニック選択マーカー遺伝子は、処理細胞から再生する植物の回収効率を高めることができるが、植物ゲノムにトランスジェニックシーケンシングを導入することが必ずしも望ましいとは限らない。さらに、選択を終えてからトランスジェニックマーカー遺伝子を排除することは、たいてい非常に複雑である。

【0010】

精密遺伝子編集またはゲノム工学は、この数年間で遺伝子工学の最重要分野の一つとして発展し、関心対象のゲノムの標的化された部位指定的な操作を可能にしている。部位指定的ゲノム工学に必要なのがプログラム可能なヌクレアーゼであり、これらは関心対象の核酸を決められた位置で切断して、二本鎖切断（DSB）または1つもしくは複数の一本鎖切断を引き起こすのに用いることができる。かわりに、これらのヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ機能は失っているが別の酵素と組み合わせられて認識分子として機能する、キメラまたは変異バリエーションの場合もある。したがって、こうしたヌクレアーゼまたはそれらのバリエーションはすべての遺伝子編集またはゲノム工学アプローチの基幹である。近年、多くの好適なヌクレアーゼ、特に、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEヌクレアーゼ、たとえばナトロノバクテリウム・グレゴリ（*Natronobacterium gregoryi*）由来のアルゴノートヌクレアーゼ、およびクラスター化反復短回文配列リピート（CRISPR）系の一部としてCRISPRヌクレアーゼ、たとえばCas、Cpf1、CasX、またはCasYヌクレアーゼなど、目的に合

40

50

わせたエンドヌクレアーゼが開発されている。

【0011】

C R I S P R (クラスタ化反復短回文配列リピート) は、自然環境ではもともと細菌内で発達したものであり、C R I S P R 系はウイルス攻撃に対し防御する適応免疫系の役割を果たす。ウイルスに曝露すると、ウイルスDNAの短いセグメントがC R I S P R 座位に組み込まれる。C R I S P R 座位の一部分からウイルス配列を含むRNAが転写される。ウイルスゲノムに対する相補配列を含有するこのRNAは、C R I S P R エフェクタータンパク質がウイルスゲノムの標的配列を標的化するのを媒介する。C R I S P R エフェクタータンパク質がウイルス標的を切断し、そうすることで複製に干渉する。過去数年で、C R I S P R 系は、真核細胞の遺伝子編集やゲノム工学にも成功裏に用いられている。現在重点的に研究されているのは、動物細胞の編集、およびヒトへの治療用途である。複雑な動物ゲノム、そして植物ゲノムでも、標的化修飾は依然として骨の折れるタスクである。

10

【0012】

自然環境でのC R I S P R 系とは、少なくとも1つの小さい単体の非コードRNAと、C a s ヌクレアーゼまたは別のC p f 1 ヌクレアーゼのようなC R I S P R ヌクレアーゼとの組み合わせを含む分子複合体のことであり (Z e t s c h e e t a l . , “ C p f 1 I s a S i n g l e R N A - G u i d e s E n d o n u c l e a s e o f a C l a s s 2 C R I S P R - C a s S y s t e m ” , C e l l , 2 0 1 5 年 10 月 , 1 6 3 , p . 1 - 1 3) 、特異的DNA二本鎖切断を生じさせることができる。今のところ、C R I S P R 系は2つのクラスに分類されており、これらのクラスには、たとえばC a s 9 をエフェクターとするI I 型系やC p f 1 をエフェクター分子とするV 型系など5つの型のC R I S P R 系が含まれる (M a k a r o v a e t a l . , N a t u r e R e v . M i c r o b i a l . , 2 0 1 5) 。人工のC R I S P R 系では、合成非コードRNAおよびC R I S P R ヌクレアーゼおよび/または任意選択によりニックーゼとして作用するように改変されているかまったくヌクレアーゼ機能をもたない修飾C R I S P R ヌクレアーゼを、c r R N A および/またはt r a c r R N A の機能を組み合わせた少なくとも1つの合成または人工ガイドRNAまたはg R N A と組み合わせることができる (M a k a r o v a e t a l . , 2 0 1 5 , 前掲) 。天然の系のC R I S P R / C a s に媒介される免疫応答にはC R I S P R - R N A (c r R N A) が必要であり、C R I S P R ヌクレアーゼの特異的活性化を制御するこのガイドRNAの成熟は、これまでに特徴付けられているさまざまなC R I S P R 系の間で大きく異なる。まず、スペーサーとしても知られる侵入DNAが、C R I S P R 座位の近位末端の2つの隣接するリピート領域の間に組み込まれる。I I 型C R I S P R 系は、干渉ステップの主要酵素としてのC a s 9 ヌクレアーゼをコードし、これらの系はc r R N A とトランス活性化RNA (t r a c r R N A) の両方をガイドモチーフとして含んでいる。これらがハイブリダイズして二本鎖 (d s) R N A 領域を形成し、これがR N A s e l l I により認識されて切断され、成熟c r R N A を形成することができる。これらは次にC a s 分子と結合することで、このヌクレアーゼを特異的に標的核酸領域に向ける。組換えg R N A 分子は、可変DNA認識領域とC a s 相互作用領域の両方を含むことができ、特定の標的核酸および所望のC a s ヌクレアーゼとは関係なく、特殊設計とすることができる。さらなるセーフティ機構として、標的核酸領域にはP A M (プロトスペーサー隣接モチーフ) が存在する必要がある。これらは、C a s 9 / R N A 複合体に認識されるDNAに直接後続しているDNA配列である。ストレプトコッカス・ピオゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) 由来のC a s 9 に対するP A M 配列は、「N G G」または「N A G」(標準I U P A C ヌクレオチドコード) として記述されている (J i n e k e t a l . , “ A p r o g r a m m a b l e d u a l - R N A - g u i d e d D N A e n d o n u c l e a s e i n a d a p t i v e b a c t e r i a l i m m u n i t y ” , S c i e n c e 2 0 1 2 , 3 3 7 : 8 1 6 - 8 2 1) 。スタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u

20

30

40

50

s)由来のCas9に対するPAM配列は、「NNGRRT」または「NNGRR(N)」である。さらなるバリエーションCRISPR/Cas9系が知られている。したがって、ナイセリア・メニンギタイデイス(*Neisseria meningitidis*) Cas9は、PAM配列NNNNGATTのところを切断する。ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*) Cas9は、PAM配列NNAAGAAWのところを切断する。最近、カンピロバクター(*Campylobacter*)のCRISPR系に関し、さらなるPAMモチーフNNNNRYACが記述されている(国際公開第2016/021973号A1)。Cpf1ヌクレアーゼについては、Cpf1-crRNA複合体が、一般にCas9系により認識されるグリッチPAMではなく、短いトリッチPAMが先行する標的DNAを効率よく切断することが記述されている(Zetsche et al., 前掲)。さらに、修飾CRISPRポリペプチドを用いることによって、特異的一本鎖切断を得ることができる。Casニッカーゼをさまざまな組換えgRNAと組み合わせて使用して、二本鎖DNAニッキングにより、非常に特異的なDNA二本鎖切断を引き起こすこともできる。さらには、2つのgRNAを使用することで、DNA結合の特異性ひいては該DNAの切断を最適化することができる。

10

【0013】

現在、たとえば、エンドヌクレアーゼとして、Cas9をはじめとするII型系またはそのバリエーションもしくは何らかのキメラ体が、ゲノム工学用に改変されている。シングルガイドRNA(sgRNA)とも呼ばれるガイドRNA(gRNA)と非特異的CRISPR関連エンドヌクレアーゼの2つの構成要素からなる合成CRISPR系は、標的化すべき遺伝子に特異的でありエンドヌクレアーゼCas9と結合できるgRNAの同時発現により、ロックアウト細胞またはロックアウト動物を作製するのに用いることができる。なお、gRNAは人工分子であり、Casまたは任意のほかのCRISPRエフェクタータンパク質またはそのバリエーションもしくは触媒活性フラグメントと相互作用する1つのドメインと、関心対象の標的核酸と相互作用するもう1つのドメインとを含み、したがってcrRNAとtracrRNAの合成融合物である(「シングルガイドRNA」(sgRNA)または単に「gRNA」; Jinek et al., 2012, 前掲)。ゲノム標的は、PAMのすぐ上流に存在するかぎり、およそ20ヌクレオチドのどのようなDNA配列でもよい。PAM配列は標的結合にとって非常に重要であり、実際の配列はCas9の種に左右される。たとえば、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)由来のCas9の場合は、5'NGG3'または5'NAG3'である(標準IUPACヌクレオチドコード)(Jinek et al., 2012, 前掲)。修飾Casヌクレアーゼを用いて、関心対象の標的配列に標的化一本鎖切断を導入することができる。このようなCasニッカーゼを種々の組換えgRNAと組み合わせて用いることで、ダブルニッキング系により、高部位特異性DNA二本鎖切断を導入することができる。1つまたは複数のgRNAを用いることで、全体的な特異性をさらに高めることができ、オフターゲットの効果を減じることができる。

20

30

【0014】

Cas9タンパク質およびgRNAは、発現すると、gRNAの「足場」ドメインとCas9の表面に露出しプラスに帯電した溝との相互作用により、リボヌクレオタンパク質複合体を形成する。重要なのは、gRNAの「スペーサー」配列は、なおも標的DNAと相互作用できることである。Cas9-gRNA複合体はPAMを有するどのようなゲノム配列にでも結合するが、gRNAスペーサーが標的DNAと適合する度合いによって、Cas9が切断するかどうかが決まる。Cas9-gRNA複合体が推定DNA標的に結合すると、gRNA標的化配列の3'末端にある「シード」配列が標的DNAにアニールし始める。シードと標的DNA配列が適合すれば、gRNAは引き続き、(gRNAの極性に対し相対的に)3'から5'の方向に標的DNAにアニールする。

40

【0015】

最近、標的化ゲノム工学では、CRISPR/Cas9系に加えて、工学CRISPR

50

/ C p f 1系がますます重要になっている（前掲の Z e t s c h e e t a l . および
 欧州特許出願公開第 3 0 0 9 5 1 1 号 A 2 明細書を参照）。この V 型系は、 I I 型系
 と同じくクラス 2 の C R I S P R 系に属する（ M a k a r o v a a n d K o o n i n
 M e t h o d s . M o l . B i o l . , 2 0 1 5 , 1 3 1 1 : 4 7 - 7 5 3
 ）。 C p f 1 エフェクタータンパク質は巨大タンパク質（約 1 3 0 0 個のアミノ酸）であ
 り、対応する C a s 9 のドメインと相同の R u v C 様ヌクレアーゼドメイン、および C a
 s 9 の特徴であるアルギニンリッチクラスターのカウンターパートを含む。しかし、 C p
 f 1 にはすべての C a s 9 タンパク質に存在する H N H ヌクレアーゼドメインがなく、 R
 u v C 様ドメインは C p f 1 配列のなかで一続きになっており、 H N H ドメインを含む長
 い挿入部が含まれる C a s 9 と異なっている（ C h y l i n s k i , 2 0 1 4 ; M a
 k a r o v a , 2 0 1 5 ）。 C a s 9 エフェクターに対し C p f 1 エフェクターが有す
 るいくつかの明白な違いとしては、 C R I S P R アレイのプロセッシングに追加のトランス
 活性化 c r R N A (t r a c r R N A) が不要であること、短い T リッチ P A M（一方の
 C a s 9 では P A M に G リッチ配列が後続）による効率のよい標的 D N A 切断、および C
 p f 1 による片方が突出した D N A 二本鎖切断の導入がある。ごく最近、 C a s X および
 C a s Y に基づいたさらなる新規の C R I S P R - C a s 系が同定されたが、これらはエ
 フェクタータンパク質のサイズが比較的小さいため、遺伝子編集またはゲノム工学の多く
 のアプローチにとって特に興味深いものである（ B u r s t e i n e t a l . , “
 N e w C R I S P R - C a s s y s t e m s f r o m u n c u l t i v a t e d
 m i c r o b e s ” , N a t u r e , 2 0 1 6 年 1 2 月）。

10

20

【 0 0 1 6 】

それでも、 C R I S P R 系自体には、標的細胞において関心対象のゲノムの所望位置で
 点変異を生成する固有の能力はない。

【 0 0 1 7 】

二本鎖切断（ D S B ）を導入する C R I S P R 系のようなゲノム工学ツールは、 D S B
 修復機構を必要とする。この機構は、非相同末端結合（ N H E J ）と相同組換え（ H R ）
 の 2 つの主要な基本タイプに分けられる。ふつう、相同性に基づいた修復機構は概して相
 同性指定修復（ H O R ）と呼ばれている。

【 0 0 1 8 】

N H E J は、動物および植物において主流の核応答であり、相同配列を必要としないが
 、エラーが起きやすいので潜在的に変異原性である（ W y m a n C . , K a n a a r
 R . “ D N A d o u b l e - s t r a n d b r e a k r e p a i r : a l l
 ' s w e l l t h a t e n d s w e l l ” , A n n u . R e v . G e n e
 t . 2 0 0 6 ; 4 0 , 3 6 3 - 8 3 ）。 H O R による修復は相同性を必要とするが
 、切断された染色体の修復にインタクトな染色体を使う H O R 経路、すなわち二本鎖切断
 修復および合成依存型鎖アニーリングは、非常に正確である。古典的 D S B 修復経路では
 、 3 ' 末端がインタクトな相同鋳型に侵入して、 D N A 修復合成のプライマーの役割を果
 たし、最終的にダブルホリデイジャンクション（ d H J ）を形成させる。 d H J は、 4 本
 鎖の分枝構造体であり、侵入鎖が伸長して第 2 の D S B 末端の D N A を「捕捉」し、そこ
 から D N A を合成して形成する。個々の H J は 2 つの方法のいずれかの切断により分解さ
 れる。合成依存型鎖アニーリングは保存的であり、非乗換え事象しか生じない。このこと
 は、新たに合成される配列がすべて、同一分子上に存在することを意味する。 N H E J 修
 復経路と異なり、鎖侵入および合成依存型鎖アニーリングの D ループ形成に続いて、侵入
 鎖の新たに合成された部分が鋳型からずらされ、他方の D S B 末端の非侵入鎖の加工末端
 に戻される。非侵入鎖の 3 ' 末端が伸長し連結して、ギャップが埋まる。切断誘導型修復
 経路と呼ばれる、まだ完全には特徴付けられていない別の H O R 経路もある。この経路の
 主な特色は、修復に使用できる侵入末端が D S B に 1 つしかないことである。

30

40

【 0 0 1 9 】

したがって現時点では、植物ゲノムに標的化点変異を導入し、この変異を活用すること
 は、難しいタスクである。さらに、部位特異的ヌクレアーゼ（ S S N ）を用いるゲノム工

50

学の潜在能力が今も直面しているのが、特に関心対象のゲノムが植物ゲノムのように複雑な真核生物のゲノムであって、育種の選択ラウンドをまたいで標的化修飾を追跡する必要がある場合に、これらSSNにより導入された修飾を選択する問題である。

【0020】

今日ゲノム工学(GE)は可能性に満ちているが、そうしたGEのアプローチの大半は、1種類のSSNを含む複合体により関心対象の標的化修飾を導入することを目的としている。したがって、このような標的化修飾を後の植物育種のために植物の生殖質に導入することが可能であるが、該標的化修飾を後から追跡するのが厄介である。選択マーカ-または選択マーカ-カセットを用いて選択および関心対象となり得る細胞の単離を支援する場合でも、関心対象の遺伝子型/表現型の組み合わせを得るために育種中何ラウンドも連続して交配させた後で、植物のゲノムからこのようなマーカ-カセットを除去するハードルはやはり相当高い。

10

【0021】

同時に、育種中、たとえば関心対象の修飾に基づいた関心対象の形質、エリート事象、または交配させるべき栽培品種の好ましい特性を決定でき、作成でき、または交配できるような、好適な新しい植物育種法の提供に対する需要が大いにある。育種の種々の工程の際に、そうした関心対象の形質の伝搬と存在について選抜することは、時に難しく、または非常に時間がかかる。

【0022】

したがって、細胞および植物を単離するより良い方法、好ましくは後続の選択ラウンド用にトランスジェニックマーカ-配列のゲノム組込みを必要としない方法が必要とされている。さらに、選択および選抜手段の目的で、高精度で部位指定的に、かつ外来性トランスジェニック配列を導入することなく作製できる選択マーカ-配列に対する高い需要もある。最後に、育種中何ラウンドも連続する交配および選択の間、関心対象の形質をまとめて生殖質にスタックしておく、高速育種を支援する新ストラテジーを定義する需要も極めて高い。

20

【0023】

したがって、本願の根底にある目的は、遺伝子編集試薬で処理し編集した細胞を、選抜しやすい表現型選択形質を用いて単離する方法を提供することであった。このために、第1の遺伝子に標的化修飾を作成してその細胞およびその子孫に選択可能なまたはほかの表現型を付与し、トランスジェニック選択マーカ-配列は導入しない。平行して、細胞に表現型を付与する場合もあるがふつうは付与しない標的化修飾を、第2の関心対象の遺伝子に作成する。該細胞およびその子孫細胞または植物を、選択因子を加えることにより、または第1の遺伝子の修飾により付与された表現型を用いてこの第1の遺伝子修飾を受けた細胞を特定するほかの方法により、無処理細胞のバックグラウンドから単離するか再生させることができる。この集団から、第2の関心対象の遺伝子に標的化修飾(実際の達成目的である第2の修飾)を有する細胞または植物を特定して、関心対象のゲノム中にトランスジェニック選択マーカ-配列が存在することまたはそれを導入することを必要とせずに、より速い、したがってより廉価な選択を提供する。

30

【0024】

発明の概要

上記で特定した目的は、本明細書で詳述するように、非トランスジェニックの表現型選択修飾の部位特定導入と、関心対象の第2の部位指定修飾の標的化導入とを平行化するストラテジーを定義することにより、達成されている。ふつう、この第2の修飾は選択には使われない。それは、第2の修飾が付与する表現型は、植物を作製するプロセスでは発現しないか関連がないためである。したがって、本発明の方法の根底にある目的は、第1の修飾を、選択を可能にするツールとして用いることである。従来ストラテジーと比べて本発明の方法は、トランスジェニックマーカ-遺伝子を組み入れない利点を有する。対応する選択因子を用いて選択できる選択表現型を用いない場合と比べると、植物生産細胞の大部分を占めることになる無処理細胞のすべてまたは大半が排除されることで、効率が上

40

50

がる利点を有する。第1の植物ゲノム標的部位に表現型選択形質の発現をもたらす標的化修飾をされていない無処理細胞を排除することで、生産しなければならない植物の数が大幅に減り、そして第2の標的化修飾について分子選抜しなければならない植物の数も大幅に減る。したがって本発明の方法は、育種効率を大幅に高め、かつ労働集約的ステップを回避する。

【0025】

具体的には、上記の目的は、第1の態様では、少なくとも1つの改変植物細胞、または該少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカ配列を安定的に組み込むことなく単離する方法を提供することにより達成されており、該方法は、(a)改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾を導入することであって、該少なくとも1つの標的化塩基修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現をもたらされる、導入すること；(b)該改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第2の標的化修飾を該第2の植物ゲノム標的部位に作成する少なくとも1つの部位特異的エフェクターを用いて導入され、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、または該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および(c)(i)該少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾により該第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた該少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに(ii)該第2の植物ゲノム標的部位の該少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、を含む。

10

20

【0026】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、方法が提供され、ここでステップ(b)が、該少なくとも1つの第2の植物ゲノム標的部位に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型を導入することをさらに含む。

30

【0027】

さらなる実施形態では、第1の態様の方法は、少なくとも1つの第1の標的化修飾および少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得るステップであって、任意選択により、該関心対象の遺伝子型は、該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、さらなるステップ(d)を含む。

【0028】

一実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、少なくとも1つの塩基編集複合体に一時的または恒久的に結合しており、該塩基編集複合体は、ステップ(a)の少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾を媒介する。

40

【0029】

さらなる実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクターは、CasもしくはCpf1ヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノートヌクレアーゼ、FokIもしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼを含むヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または2部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、または塩基エディター、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも1つから選択される。

【0030】

さらなる実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクターは、CRISPRベ

50

ースのヌクレアーゼであり、該CRISPRベースのヌクレアーゼは、少なくとも1つの塩基編集複合体を導く部位特異的DNA結合ドメインを含み、該少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、(a) SpCas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、VQR-Cas9、St1Cas9を含む、Cas9、(b) Ascpf1、LbCpf1、FnCpf1を含む、Cpf1、(c) CasX、および(d) CasY、ならびに前述のCRISPRベースのヌクレアーゼの任意のバリエーションおよび誘導体を含む群より選択され、好ましくは該少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたCRISPRベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的DNAニッカーゼに、または全DNA切断能力を失ったDNA結合エフェクターに変換されている。

10

【0031】

一実施形態では、第1の態様の少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、少なくとも1つの塩基エディターを構成要素として含む少なくとも1つの塩基編集複合体により作成される。

【0032】

一実施形態では、塩基編集複合体は、少なくとも1つのシチジンデアミナーゼ、またはその触媒活性フラグメントを含む。

【0033】

さらなる実施形態では、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、ヌクレオチドC、A、T、またはGのいずれかの、任意のほかのヌクレオチドへの変換である。

20

【0034】

本発明の方法の一実施形態では、塩基編集複合体は、APOBEC1構成要素、UGI構成要素、XTEN構成要素、またはPmCDA1構成要素を少なくとも1つ含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの塩基編集複合体は2つ以上の構成要素を含み、該少なくとも2つの構成要素は物理的に結合している。

【0035】

本発明の方法の一実施形態では、少なくとも1つの塩基編集複合体は2つ以上の構成要素を含み、該少なくとも2つの構成要素は単体の構成要素として与えられている。

【0036】

本発明の方法のさらなる実施形態では、少なくとも1つの塩基編集複合体の少なくとも1つの構成要素が、該少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けるために少なくとも1つの小器官局在化シグナルを含む。一実施形態では、少なくとも1つの小器官局在化シグナルは、核局在化シグナル(NLS)であり、さらなる実施形態では、少なくとも1つの小器官局在化シグナルは、葉緑体輸送ペプチドである。さらなる実施形態では、少なくとも1つの小器官局在化シグナルは、ミトコンドリア輸送ペプチドである。

30

【0037】

本発明の方法の一態様では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、少なくとも1つの表現型選択形質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位の少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する。

40

【0038】

一実施形態では、関心対象の少なくとも1つの表現型選択形質は、少なくとも1つの内在性遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、あるいは関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、少なくとも1つの内在性遺伝子または少なくとも1つの導入遺伝子は、関心対象の少なくとも1つの表現型形質に少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速

50

度、胚発生のブースターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される。

【0039】

一実施形態では、少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位は、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むEPSPS阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むALSまたはHAS阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリーロキシフェノキシプロピオネート(FOP)を含むACCase阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド生合成阻害剤、4-ヒドロキシフェニル-ビルビン酸-ジオキシゲナーゼ(HPD)阻害剤、またはほかのカロテノイド生合成標的の阻害剤を含むカロテノイド生合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系I電子ダイパーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系II阻害剤に対する抵抗性/耐性、PPO阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンバ(2,4-D、すなわち2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシニンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される。

10

20

【0040】

さらなる実施形態では、少なくとも1つの表現型選択形質は、植物毒抵抗性/耐性形質、好ましくは除草剤抵抗性/耐性形質であり、改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位の少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、植物毒化合物、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性を付与し、該化合物は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体、またはその子孫に加えられる外来性化合物である。

【0041】

一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、ALSである。別の実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、PPOである。さらに別の実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、EPSPS、ALS、またはPPOであり、EPSPS、ALS、またはPPOは、少なくとも1つの対応するアミノ酸変換をもたらす少なくとも1つの核酸変換を含み、少なくとも1つの核酸変換は、少なくとも1つの塩基エディターにより作成される。

30

【0042】

一実施形態では、本発明の方法は、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に標的化修飾を導入することを含み、該第1の植物ゲノム標的部位はALSであり、標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてA122をコードする配列に生じ、または配列番号25のALS基準配列と比べてP197をコードする配列に生じ、または配列番号25のALS基準配列と比べてA205をコードする配列に生じ、または配列番号25のALS基準配列と比べてD376をコードする配列に生じ、または配列番号25のALS基準配列と比べてR377をコードする配列に生じる。さらに別の実施形態では、標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてW574をコードする配列に生じる。一実施形態では、標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてS653をコードする配列に生じる。一実施形態では、標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてG654をコードする配列に生じる。

40

【0043】

本発明の方法の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位はPPOであり、標的化修飾は配列番号26のPPO基準配列と比べてC215をコードする配列に生じる。別の実施形態では、標的化修飾は配列番号26のPPO基準配列と比べてA220をコードする配列に生じる。さらなる実施形態では、標的化修飾は配列番

50

号26のPPO基準配列と比べてG221をコードする配列に生じる。さらなる実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位はPPOであり、標的化修飾は配列番号26のPPO基準配列と比べてN425をコードする配列に、またはY426をコードする配列に、または配列番号26のPPO基準配列と比べてI475をコードする配列に生じる。

【0044】

本発明の方法の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位はEPSPSであり、標的化修飾は、いずれも配列番号27のEPSPS基準配列と比べて、G101およびG144をコードする配列に、G101およびA192をコードする配列に、またはT102およびP106をコードする配列に生じる。

10

【0045】

第1のゲノム標的部位の標的化修飾のさらなる組み合わせまたは追加の修飾は、本発明の範囲内である。

【0046】

本発明の方法の一実施形態では、少なくとも1つの表現型選択形質は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体の特定または単離に便利な可視表現型である。少なくとも1つの表現型選択形質は、光沢表現型、ゴールド表現型、成長優位性表現型、もしくは着色表現型、または任意のほかの目視で選抜可能な表現型であってもよい。

【0047】

本発明の第2の態様では、少なくとも1つの改変植物細胞、または該少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカ配列を安定的に組み込むことなく単離する方法を提供し、該方法は、(a)改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に、ヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、またはDNA修飾試薬を含む少なくとも1つの第1の部位特異的エフェクターを用いて、少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾を導入することであって、該少なくとも1つの標的化コドン欠失修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；(b)該改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第2の標的化修飾を該第2の植物ゲノム標的部位に作成する少なくとも1つの第2の部位特異的エフェクターを用いて導入され、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、または該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および(c)(i)該少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾により該第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた該少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに(ii)該第2の植物ゲノム標的部位の該少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、(d)任意選択により、該少なくとも1つの第1の標的化修飾および該少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得ることであって、任意選択により、該関心対象の遺伝子型は、該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、交配させること、を含む。

20

30

40

【0048】

本発明のさらなる態様では、少なくとも1つの改変植物細胞、または該少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカ配列を安定的に組み込むことなく単離する方法を提供し、該方法は、(a)改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に、少な

50

くとも1つの第1の部位特異的エフェクターを用いて、少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾を導入することであって、該少なくとも1つの標的化フレームシフトまたは欠失修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；(b)該改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第2の標的化修飾を該第2の植物ゲノム標的部位に作成するヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、またはDNA修飾試薬を含む少なくとも1つの第2の部位特異的エフェクターを用いて導入され、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、または該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物体に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および(c)(i)該少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾により該第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた該少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに(ii)該第2の植物ゲノム標的部位の該少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、(d)任意選択により、該少なくとも1つの第1の標的化修飾および該少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得ることであって、任意選択により、該関心対象の遺伝子型は、該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、交配させること、を含む。

【0049】

上記態様の一実施形態では、好ましくはステップ(b)が、少なくとも1つの第1のおよび/または第2の植物ゲノム標的部位に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型を導入することをさらに含む。

【0050】

さらなる実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクターは、CasもしくはCpf1ヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノートヌクレアーゼ、FokIもしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または2部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも1つから選択される。

【0051】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクターは、CRISPRベースのヌクレアーゼであり、該CRISPRベースのヌクレアーゼは、部位特異的DNA結合ドメインを含み、該少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、(a)SpCas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、VQR-Cas9、St1Cas9を含む、Cas9、(b)AscPpf1、LbCpf1、FnCpf1を含む、Cpf1、(c)CasX、および(d)CasY、ならびに前述のCRISPRベースのヌクレアーゼの任意のバリエーションおよび誘導体を含む群より選択され、任意選択により該少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたCRISPRベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的DNAニッカーゼに、または全DNA切断能力を失ったDNA結合エフェクターに変換されている。

【0052】

本発明の態様のさらなる実施形態では、少なくとも部位特異的エフェクター、または該少なくとも1つの部位特異的エフェクターを含む複合体の少なくとも1つの構成要素が、該少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けるために少なくとも1つの小器

官局在化シグナルを含み、該少なくとも1つの小器官局在化シグナルは、核局在化シグナル(NLS)、葉緑体輸送ペプチド、またはミトコンドリア輸送ペプチドから選択される。

【0053】

上記態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、少なくとも1つの表現型選択形質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位の少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する。

10

【0054】

上記態様のさらなる実施形態では、関心対象の少なくとも1つの表現型選択形質は、少なくとも1つの内在性遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、あるいは関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、少なくとも1つの内在性遺伝子または少なくとも1つの導入遺伝子は、関心対象の少なくとも1つの表現型形質に少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速度、胚発生のブラスターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される。

20

【0055】

上記態様のさらなる実施形態では、少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位は、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むEPS阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むALSまたはAHAS阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリアルオキシフェノキシプロピオネート(FOP)を含むACCase阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド生合成阻害剤、4-ヒドロキシフェニル-ピルビン酸-ジオキシゲナーゼ(HPD)阻害剤、またはほかのカロテノイド生合成標的の阻害剤を含むカロテノイド生合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系I電子ダイバーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系II阻害剤に対する抵抗性/耐性、PPO阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンバ(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシニンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される。

30

【0056】

上記態様の一実施形態では、少なくとも1つの表現型選択形質は、植物毒抵抗性/耐性形質、好ましくは除草剤抵抗性/耐性形質であり、改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位の少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失またはフレームシフトもしくは欠失修飾により、植物毒化合物、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性が付与され、該化合物は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体、またはその子孫に加えられる外来性化合物である。

40

【0057】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、選択の目的で、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、アマランサス・ツベルクラタス(Amaranthus tuberculatus)のPPX2L遺伝子産物のホモログである。

【0058】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾、

50

標的化コドン欠失、または標的化フレームシフトもしくは欠失修飾は、配列番号28のアマランサス・ツベルクラタス (*Amaranthus tuberculatus*) の P P X 2 L 遺伝子産物の G 2 1 0 残基に相当する位置に生じる。

【0059】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの表現型選択形質は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体の特定または単離に便利な可視表現型である。本発明のさまざまな態様の少なくとも1つの表現型選択形質は、光沢表現型、ゴールドデン表現型、成長優位性表現型、もしくは着色表現型、または任意のほかの目視で選抜可能な表現型であり得る。

【0060】

本発明の全態様の方法の一実施形態では、改変すべき少なくとも1つの植物細胞は、好ましくは、ホルデウム・ウルガレ (*Hordeum vulgare*)、ホルデウム・バルバゾム (*Hordeum bulbosum*)、ソルガム・ビコロ (*Sorghum bicolor*)、サッカラム・オフィシナリウム (*Saccharum officinarum*)、ゼア・メイズ (*Zea mays*) などのゼア (*Zea*) spp.、セタリア・イタリカ (*Setaria italica*)、オリザ・ミヌタ (*Oryza minuta*)、オリザ・サチワ (*Oryza sativa*)、オリザ・アウストラリエンシス (*Oryza australiensis*)、オリザ・アルタ (*Oryza alta*)、トリチカム・アエスチウム (*Triticum aestivum*)、トリチカム・デュラム (*Triticum durum*)、セカレ・ケレアレ (*Secale cereale*)、トリチカレ (*Triticale*)、マルス・ドメスチカ (*Malus domestica*)、ブラキポジウム・ジスタキオン (*Brachypodium distachyon*)、ホルデウム・マリナム (*Hordeum marinum*)、アエギロプス・タウスキイ (*Aegilops tauschii*)、ダウカス・グロキジアタス (*Daucus glochidiatus*)、ベタ・ウルガリス (*Beta vulgaris*) などのベタ (*Beta*) spp.、ダウカス・プシルス (*Daucus pusillus*)、ダウカス・ムリカタス (*Daucus muricatus*)、ダウカス・カロタ (*Daucus carota*)、ユーカリプタス・グランジス (*Eucalyptus grandis*)、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ・トメントシホルミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ・ベンタミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ソラナム・リコベルシカム (*Solanum lycopersicum*)、ソラナム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、コフェア・カネフォラ (*Coffea canephora*)、ウイティス・ウイニフェラ (*Vitis vinifera*)、エリトランテ・グッタータ (*Erythranthe guttata*)、ゲンリセア・アウレア (*Genlisea aurea*)、ククミス・サチウス (*Cucumis sativus*)、マルス・ノタビリス (*Marus notabilis*)、アラビドプシス・アレノサ (*Arabidopsis arenosa*)、アラビドプシス・リラタ (*Arabidopsis lyrata*)、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ (*Crucihimalaya himalaica*)、クルキヒマラヤ・ワリキイ (*Crucihimalaya wallichii*)、カルダミネ・ネクスオサ (*Cardamine nexuosa*)、レピジウム・ウイルギニカム (*Lepidium virginicum*)、カプセラ・ブルサ・パストリス (*Capsella bursa pastoris*)、オルマラビドプシス・プミラ (*Olmarabidopsis pumilla*)、アラビス・ヒルステ (*Arabis hirsute*)、ブラシカ・ナプス (*Brassica napus*)、ブラシカ・オレラケア (*Brassica oleracea*)、ブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*)、ラファヌス・サチウス (*Raphanus sativus*)、ブラシカ・ユンカケア (*Brassica jun*

10

20

30

40

50

caceae)、ブラシカ・ニグラ (*Brassica nigra*)、エルカ・ウエシカリア subsp. サチワ (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*)、シトラス・シネンシス (*Citrus sinensis*)、ジャトロファ・クルカス (*Jatropha curcas*)、ポプラス・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*)、メジカゴ・トランカツラ (*Medicago truncatula*)、キケル・ヤマシタエ (*Cicer yamashitae*)、キケル・ピユガム (*Cicer bijugum*)、キケル・アリエチナム (*Cicer arietinum*)、キケル・レチクラタム (*Cicer reticulatum*)、キケル・ユダイカム (*Cicer judaicum*)、カヤナス・カヤニフォリウス (*Cajanus cajanifolius*)、カヤナス・スカラバエオイデス (*Cajanus scarabaeoides*)、ファセオラス・ウルガリス (*Phaseolus vulgaris*)、グリキネ・マクス (*Glycine max*)、ゴシビウム (*Gossypium*) sp.、アストラガラス・シニカス (*Astragalus sinicus*)、ロータス・ヤポニカス (*Lotus japonicas*)、トレニア・フォーウルニエリ (*Torenia fournieri*)、アリウム・ケパ (*Allium cepa*)、アリウム・フィスツロサム (*Allium fistulosum*)、アリウム・サチウム (*Allium sativum*)、ヘリアンタス・アヌウス (*Helianthus annuus*)、ヘリアンタス・ツベロサス (*Helianthus tuberosus*) およびアリウム・ツベロサム (*Allium tuberosum*) かなる群より選択される植物または前述の植物の1つに属するあらゆる変種もしくは亜種に由来する。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1 (図1A~1C) は、たとえば植物育種および標的化選択戦略用の選択の間、関心対象の細胞を単離するために、本発明の方法をどのように実施するかを例示している。図1Aでは、塩基エディター (BE) またはBE複合体と、編集試薬すなわち部位特異的ヌクレアーゼ (SSN) を含む部位特異的エフェクターとを用いて、2つの異なるゲノム位置で平行して細胞を処理している。矢印は標的部位を示し、塩基エディター (複合体) と部位特異的エフェクターとが2つの標的化部位特異的修飾を導入することになる。図1Bは、図1Aに例示した先行ステップの結果を示しており、すなわちBE (複合体) が修飾された表現型を関心対象の遺伝子に導入し (白でハイライト)、部位特異的エフェクターが標的化編集を形質遺伝子に導入する (黒でハイライト)。したがって、2つの異なるゲノム標的部位でのこれら2つの別個の修飾は、植物細胞または植物を処理細胞から単離することを可能にする。次に、関心対象の遺伝子の編集について植物を選抜することができるが、それはふつう、選抜目的で使用される修飾表現型とは異なっている。そして図1Cは、所望の遺伝子型を得るために植物を分離した後の結果を示す。この関心対象の所望の遺伝子型は、部位特異的エフェクターにより導入された標的化修飾 (黒) を含んでいるが、修飾された表現型修飾はもう含んでいない。後者は選択目的で導入されていたが、この例で得られた植物細胞、組織、器官、または植物体のゲノムに含まれるゲノム形質として導入されたわけではない。

【図2】TaALS-S1部位の同時編集により向上した選抜効率を例示する図である。

【図3】TaALS-P173の編集による除草剤抵抗性コムギの作製を例示する図である。

【図4】ZmALS-P165の編集による除草剤抵抗性トウモロコシの作製を例示する図である。

【図5】トウモロコシにおいて編集すべき配列構造および除草剤抵抗性部位を例示する図である。

【図6】ZmALS-P197およびZmALS-G654の高効率の編集を例示する図である。

【図7】ZmALS-P197およびZmALS-G654を望ましい除草剤抵抗性を付

与する残基に変換する効率を例示する図である。

【0062】

配列：

配列番号1は、APOBEC1（ラットシチジンデアミナーゼ）-XTENリンカー（たとえば Schellenberger et al., “A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner”, Nature Biotechnol. (2009) 27, p. 1186-1190を参照）-nCas9（D10A）-UGI（ウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤）-NLSをコードするコンストラクトのヌクレオチド配列であり、コドン最適化されなかった。この配列は、3'終止コドンTAAを含む。

10

【0063】

配列番号2は、APOBEC1-XTENリンカー-nCas9（D10A）-UGI-NLSをコードするコンストラクトのヌクレオチド配列であり、穀類植物で使用されるようにコドン最適化された。この配列は、3'終止コドンTAGを含む。

【0064】

配列番号3は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__ALS1&2__P197S/L/Fの例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス（Arabidopsis）ALSホモログの残基の座標に基づく。この配列は、SpCas9由来（ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）Cas9由来）ベースのエディターに適用する。

20

【0065】

配列番号4は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__ALS1&2__P197S/L/Fの例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス（Arabidopsis）ALSホモログの残基の座標に基づく。この配列は、SaKKH-BE3由来のベースのエディター（PAM特異性が緩い、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）Cas9（SaCas9）由来変異体のSaCas9）に適用する。

【0066】

配列番号5は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__ALS1&2__P197S/L/Fの例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス（Arabidopsis）ALSホモログの残基の座標に基づく。この配列は、VQR-BE3由来のベースのエディター（PAM特異性が異なる、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）Cas9（SaCas9）由来変異体のSaCas9）に適用する。

30

【0067】

配列番号6は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__ALS1&2__S653Nの例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス（Arabidopsis）ALSホモログの残基の座標に基づく。この配列は、SpCas9由来のベースのエディターに適用する。

40

【0068】

配列番号7は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__PPO__A220__&__G221の例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス（Arabidopsis）PPOホモログの残基の座標に基づく。この配列は、SpCas9由来のベースのエディターに適用する。

【0069】

配列番号8は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__PPO__A220__&__G221の例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス（Arabidopsis）PPOホモログの残基の座標に基づく。この配列は、SaKKH-BE3由来のベースのエディターに適用する。

50

【0070】

配列番号9は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__PPO__A220__&__G221の例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス(Arabidopsis)PPOホモログの残基の座標に基づく。この配列は、VQR-BE3由来のベースのエディターに適用する。

【0071】

配列番号10は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__PPO__C215の例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス(Arabidopsis)PPOホモログの残基の座標に基づく。この配列は、SpCas9由来のベースのエディターに適用する。

10

【0072】

配列番号11は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__PPO__C215の例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス(Arabidopsis)PPOホモログの残基の座標に基づく。この配列は、SaKKH-BE3由来のベースのエディターに適用する。

【0073】

配列番号12は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__PPO__C215の例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス(Arabidopsis)PPOホモログの残基の座標に基づく。この配列は、SaKKH-BE3由来のベースのエディターに適用する。

20

【0074】

配列番号13は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__PPO__C215の例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス(Arabidopsis)PPOホモログの残基の座標に基づく。この配列は、VQR-BE3由来のベースのエディターに適用する。

【0075】

配列番号14は、APOBEC1-XTENリンカー-CasX1-UGI-NLSをコードするコンストラクトのヌクレオチド配列であり、コドン最適化された。この配列は3'終止コドンTAGを含む。

【0076】

配列番号15は、APOBEC1-XTENリンカー-AscPf1(R1226A)(R1226A変異を有するアシダミノコッカス(Acidaminococcus)sp. Cpf1)-UGI-NLSをコードするコンストラクトのヌクレオチド配列であり、コドン最適化された。この配列は3'終止コドンTAGを含む。

30

【0077】

配列番号16は、NLS-dCas9-NLS-リンカー-PmCDA1(ウミヤツメウナギの活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)オルソログPmCDA1、Nishida et al. (Science 2016, vol. 353, issue 6305, aaf8729)を参照)-UGIをコードするコンストラクトのヌクレオチド配列である。この配列は3'終止コドンTAGを含む。

40

【0078】

配列番号17は、例示的Cas9ニッカーゼn(i)Cas9(D10A)をコードするヌクレオチド配列である。

【0079】

配列番号18は、例示的CasXをコードするヌクレオチド配列である。

【0080】

配列番号19は、例示的AscPf1(R1226A)をコードするヌクレオチド配列である。

【0081】

配列番号20は、例示的APOBEC1をコードするヌクレオチド配列である。

50

【0082】

配列番号21は、例示的UGIをコードするヌクレオチド配列である。

【0083】

配列番号22は、例示的PmCDA1をコードするヌクレオチド配列である。

【0084】

配列番号23は、B73基準遺伝子型の塩基編集用Zm__PPO__N425__&Y426の例示的プロトスペーサー配列である。位置は、アラビドプシス(Arabidopsis)PPOホモログの残基の座標に基づく。この配列は、VQR-BE3由来のベースのエディターに適用する。

【0085】

配列番号24は、アシダミノコッカス(Acidaminococcus)sp BV3L6 Cpf1(Ascpf1)の配列である。UniProtKB/Swiss-Prot識別子:U2UMQ6.1。

【0086】

配列番号25は、アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana)のアセト乳酸シンターゼ(ALS)(葉緑体)の配列である。GenBank:AAW70386。

【0087】

配列番号26は、アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana)のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(PPO)の配列である。

【0088】

配列番号27は、葉緑体輸送ペプチド除去後の成熟タンパク質、アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana)の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ(EPSPS)の配列である。NCBI受託AA Y25438。

【0089】

配列番号28は、アマランサス・ツベルクラタス(Amaranthus tuberculatus)のミトコンドリアプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(PPX2L)の配列である。NCBI受託DQ386114を参照。

【0090】

定義：

本明細書では、文脈により別途明示されないかぎり、単数形の「a」、「an」、および「the」が複数形も包含することに注意されたい。たとえば、1つの構成要素への言及は、複数の構成要素の組成物も含むものとする。「a(1つの)」構成成分を含む組成物への言及は、該構成成分に加えてほかの複数の構成成分を含むものとする。換言すると、「a」、「an」、および「the」という用語は数を限定する意味ではなく、言及するものが「少なくとも1つ」存在することを意味する。各用語は、当業者が理解する最も広い意味を想定しており、同じ目的を実現するために同様に機能するあらゆる技術的均物を含むものとする。

【0091】

本明細書では、範囲は、「約」もしくは「およそ」もしくは「実質的に」1つの特定の値から、および/または「約」もしくは「およそ」もしくは「実質的に」別の特定の値まで、と表現される場合がある。そのような範囲が表現されている場合、ほかの例示的实施形態も、この1つの特定の値から、および/またはこの別の特定の値までを含む。さらに、「約」という用語は、当業者により決定される特定値の許容可能な誤差範囲内を意味するが、これはその値がどのように測定され、または決定されるか、すなわち測定システムの限界に左右される部分もある。たとえば、「約」は当技術分野の慣行にしたがい許容される標準偏差内を意味する場合がある。かわりに、「約」は、所与の値の最大±20%、好ましくは最大5~±10%、より好ましくは最大±5%、さらに好ましくは最大±1%の範囲を意味する場合がある。かわりに、特に生物学的系またはプロセスに関して、この用語はある値の10倍以内、好ましくは2倍以内を意味する場合がある。本願および特許

10

20

30

40

50

請求の範囲で特定の値が記載されている場合、特に断らないかぎり、「約」という用語が言外に含まれており、そしてこの文脈で、特定の値の許容可能な誤差範囲内であることを意味する。

【0092】

「comprising」または「containing」または「including」は、組成物または物品または方法に、少なくとも言及された化合物、元素、粒子、または方法ステップが存在することを意味するが、たとえ該言及されたものと同じ機能を持つ場合でもほかの化合物、物質、粒子、方法ステップの存在を排除するものではない。

【0093】

本明細書では、アミノ酸配列に関する「触媒活性フラグメント」という用語は、所与の鑄型アミノ酸配列またはそれをコードする核酸配列に由来する、該鑄型配列の活性部位を全部または一部含むコア配列を意味し、ただし得られた触媒活性フラグメントは、該鑄型配列を特徴付けるネイティブ酵素またはそのパリアントの活性部位に基づく活性をなおも有している。このような改変は、鑄型配列と同じ活性をもちながらサイズがより小さいアミノ酸配列を生産するのに好適であり、触媒活性フラグメントがより汎用的な、または立体的により扱いやすいより安定したツールとなる。

10

【0094】

本明細書では、「相補(的)」または「相補性」とは、2つのDNA間の、2つのRNA間の、または本発明のハイブリッド配列に関していえばRNAとDNA核酸領域間の関係のことである。DNAまたはRNAの核酸塩基により定められる2つの核酸領域は、鍵と鍵穴モデルにしたがい互いにハイブリダイズすることができる。これには、塩基アデニンとチミン/ウラシル、そしてグアニンとシトシンのそれぞれを相補塩基とするワトソン-クリックの塩基対形成理論が適用される。さらに、ワトソン-クリックの塩基対形成以外の、逆ワトソン-クリック、フーグスティーン、逆フーグスティーン、およびウォッブルの塩基対形成も、それぞれの塩基対が互いに水素結合を形成できるかぎり、すなわちこの相補性に基づき2つの異なる核酸鎖が互いにハイブリダイズすることができるかぎり、本明細書では「相補」という用語に包含される。

20

【0095】

本明細書では、「コンストラクト」という用語、特に「遺伝子コンストラクト」または「組換えコンストラクト」または「発現コンストラクト」という用語は、本開示の標的細胞または植物、植物細胞、組織、器官、もしくは植物物質への導入または形質転換、形質移入または形質導入のためのコンストラクトを指し、とりわけプラスミドまたはプラスミドベクター、コスミド、人工酵母染色体(YAC)または細菌人工染色体(BAC)、ファージミド、細菌ファージベースのベクター、発現カセット、DNAおよびRNA配列またはアミノ酸配列を含む単離された一本鎖または二本鎖核酸配列、改造ウイルスなどのウイルスベクター、およびそれらの組み合わせまたは混合物を包含する。本発明の組換えコンストラクトは、核酸またはアミノ酸配列の形態のエフェクタードメインを含む場合があり、ここでエフェクタードメインは、標的細胞内で作用することができる分子であり、導入遺伝子、一本鎖もしくは二本鎖RNA分子、たとえばガイドRNA、miRNA、シングルもしくはデュプレックスCRISPR *tracr* / *cr* RNA、またはsiRNA、あるいはアミノ酸配列、たとえば、とりわけ酵素もしくはその触媒活性フラグメント、結合タンパク質、抗体、転写因子、ヌクレアーゼ、好ましくは部位特異性ヌクレアーゼ等を包含する。さらに、組換えコンストラクトは、制御配列および/または局在化配列を含む場合がある。組換えコンストラクトは、プラスミドベクターなどのベクターに組み込まれる場合があり、かつ/またはベクター構造から単離されて、たとえばポリペプチド配列の形態で、またはベクターと結合していない一本鎖もしくは二本鎖核酸として存在する場合もある。遺伝子コンストラクトは、たとえば形質転換による導入後、たとえば二本鎖もしくは一本鎖DNA、または二本鎖もしくは一本鎖RNAの形態で、またはアミノ酸配列として、染色体外に留まること、すなわち標的細胞のゲノムに組み込まれないこともある。かわりに、本開示の遺伝子コンストラクトまたはその一部は、標的細胞のゲノム、たとえ

30

40

50

ば標的細胞の核ゲノムまたはさらなる遺伝要素、たとえばミトコンドリアまたは葉緑体のようなプラスチドのゲノムに、安定して組み込まれる場合もある。これに関して使用される「プラスミドベクター」という用語は、もとはプラスミドから得られた遺伝子コンストラクトを指す。

【0096】

本明細書では「送達コンストラクト」または「送達ベクター」という用語は、標的細胞、好ましくは真核細胞に、核酸、たとえばRNAおよびDNAを含むハイブリッド核酸、および/または関心対象のアミノ酸配列を輸送するためのカーゴとして用いられる、あらゆる生物学的または化学的手段を指す。したがって、本明細書では送達コンストラクトまたはベクターという用語は、本開示の遺伝子コンストラクトまたは組換えコンストラクトを標的細胞、組織、器官、または生物に送達するための輸送手段を指す。したがって、ベクターは、関心対象の標的細胞に、または植物の所望の細胞コンパートメントの植物標的構造に、直接的または間接的に送達される、任意選択により制御配列または局在化配列のような配列を含む核酸配列を含む場合がある。ベクターはまた、アミノ酸配列またはリボ核-分子複合体を標的細胞または標的構造に導入するのに用いられる場合もある。本明細書ではふつう、ベクターはプラスミドベクターの場合がある。さらに、本発明の特定の好ましい実施形態では、関心対象のコンストラクトまたは配列または複合体の直接導入を実施する。直接導入という用語は、本開示にしたがい修飾すべきDNA標的配列を含む所望の標的細胞または標的構造が、関心対象の特定の標的細胞へ直接的に形質転換または形質導入または形質移入され、送達ベクターにより送達された物質がそこで作用することを意味する。間接的導入という用語は、それ自体は形質転換の実際の関心対象の標的細胞または構造ではない構造体、たとえば葉の細胞または器官もしくは組織の細胞に導入することを意味するが、そうした構造体は、好ましくは本開示の遺伝子コンストラクトを含むベクターを、実際の標的構造、たとえば分裂組織の細胞もしくは組織、または幹細胞もしくは組織の全体に拡散し移入する拠点の役割を果たす。ベクターという用語をアミノ酸配列および/または核酸配列、たとえばハイブリッド核酸配列を標的細胞に形質移入する文脈で使用する場合、ベクターという用語は、たとえばイオン性脂質混合物、細胞貫通ペプチド(CPP)、または微粒子銃のような、ペプチドまたはタンパク質形質移入に好適な因子を意味する。核酸物質の導入という文脈では、ベクターという用語は、プラスミドベクターだけでなく、関心対象の標的細胞に、たとえば微粒子銃により核酸および/またはアミノ酸配列の送達を導入する拠点となる好適な担体物質を意味する場合もある。このような担体物質としては、とりわけ金またはタングステンの粒子が挙げられる。最後に、ベクターという用語はまた、本開示の少なくとも1つの遺伝子コンストラクトを導入するための、たとえば以下のウイルス株由来のたとえば改造ウイルスのような、ウイルスベクターの使用を意味する：アデノウイルスもしくはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV-1)、ワクシニアウイルス、センダイウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林アルファウイルス、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、トウモロコシ条斑ウイルス(MSV)、オオムギ斑葉ウイルス(BSMV)、プロムモザイクウイルス(BMV、受託番号：RNA1：X58456；RNA2：X58457；RNA3：X58458)、トウモロコシ条斑ウイルス(MSpV)、トウモロコシrayadofinoウイルス(MYDV)、トウモロコシ萎縮モザイクウイルス(MDMV)、ベニウイルス科(Benyviridae)、たとえばビートエソ性葉脈黄化ウイルスのウイルス種(受託番号：RNA1：NC__003514；RNA2：NC__003515；RNA3：NC__003516；RNA4：NC__003517)、またはプロモウイルス科(Bromoviridae)、たとえばアルファルファ・モザイクウイルス属(受託番号：RNA1：NC__001495；RNA2：NC__002024；RNA3：NC__002025)またはプロモウイルス属(Bromovirus)のウイルス種、たとえばBMV(前掲)、またはククモウイルス属(Cucumovirus)のウイルス種、たとえばキュウリモザイクウイルス(受託番号：RNA1：NC__002034；

10

20

30

40

50

RNA2:NC__002035;RNA3:NC__001440)、またはオレアウイルス属(Oleavirus)のウイルス種の、プラス鎖RNAウイルス、カリモウイルス科(Caulimoviridae)、特にバドナウイルス科(Badnavirus)またはカリモウイルス科(Caulimovirus)、たとえば種々のバナナ条斑ウイルス(たとえば、受託番号:NC__007002、NC__015507、NC__006955またはNC__003381)またはカリフラワーモザイクウイルス(受託番号:NC__001497)、またはカベモウイルス属(Cavemovirus)、ペチュウイルス属(Petuvirus)、ロザドナウイルス属(Rosadnavirus)、ソレンドウイルス属(Solendovirus)、ソイモウイルス属(Soymovirus)またはツングロウイルス属(Tungrovirus)のウイルス種の、dsDNAウイルス、

クロステロウイルス科(Closteroviridae)、たとえばアンペロウイルス属(Ampelovirus)、クリニウイルス属(Crinivirus)、たとえばレタス伝染性黄色ウイルス(受託番号:RNA1:NC__003617;RNA2:NC__003618)またはトマトクロシスウイルス(受託番号:RNA1:NC__007340;RNA2:NC__007341)、クロステロウイルス属(Closterovirus)、たとえばビート萎黄ウイルス(受託番号:NC__001598)、またはベラリウイルス属(Velarivirus)の、プラス鎖RNAウイルス、

ジェミニウイルス科(Geminiviridae)、たとえばベクルトウイルス科(Becurtovirus)、ベゴモウイルス科(Begomovirus)のウイルス種、たとえばインゲンマメゴールデンイエローモザイクウイルス、タバコ巻莖(Tobacco curly shoot)ウイルス、タバコ斑巻葉(Tobacco mottled leaf curl)ウイルス、トマト退緑斑紋(Tomato chlorotic mottle)ウイルス、トマト葉萎縮ウイルス、トマトゴールデンモザイクウイルス、トマト巻葉ウイルス、トマト斑紋ウイルスもしくはトマト黄点ウイルス、またはクルトウイルス属(Curtovirus)のジェミニウイルス科(Geminiviridae)、たとえばビートカーリートップウイルス、またはトボクウイルス属(Topocuvirus)、ツルンクルトウイルス属(Turncurtvirus)もしくはマストレウイルス属(Mastrevirus)のジェミニウイルス科(Geminiviridae)、たとえばトウモロコシ条斑ウイルス(前掲)、タバコ黄萎ウイルス、コムギ萎縮ウイルスの、一本鎖DNA(+/-)ウイルス、

ルテオウイルス科(Luteoviridae)、たとえばルテオウイルス属(Luteovirus)、たとえばオオムギ黄萎ウイルス-PAV(受託番号:NC__004750)、またはポレロウイルス属(Polerovirus)、たとえばジャガイモ葉巻ウイルス(受託番号:NC__001747)の、プラス鎖RNAウイルス、

ナノウイルス属(Nanovirus)またはバブウイルス属(Babuvirus)を含むナノウイルス科(Nanoviridae)の一本鎖DNAウイルス、

とりわけアルファパルチチウイルス(Alphapartitivirus)、ベータパルチチウイルス(Betapartitivirus)デルタパルチチウイルス(Deltapartitivirus)などの科を含む、パルチウイルス科(Paritiviridae)の、二本鎖RNAウイルス、

ポスピウイルス科(Pospiviroidae)のウイルス、

たとえばブランビウイルス属(Brambyvirus)、バイモウイルス属(Bymovirus)、イポモウイルス属(Ipomovirus)、マクルラウイルス属(Macluravirus)、ポエースウイルス属(Poacevirus)を含むポティウイルス科(Potyviridae)、たとえばトリチカムモザイクウイルス(受託番号:NC__012799)、またはポティウイルス属(Potyvirus)のポティウイルス(Potyviridae)、たとえばビートモザイクウイルス(受託番号:NC__005304)、トウモロコシ萎縮モザイクウイルス(受託番号:NC__003377)、ジャガイモウイルスY(受託番号:NC__001616)、もしくはゼアモザイクウイ

10

20

30

40

50

ルス（受託番号：NC__018833）、またはトリチモウイルス属（*Tritimovirus*）のポティウイルス（*Potyviridae*）、たとえばブロム条斑モザイクウイルス（受託番号：NC__003501）もしくはコムギ条斑モザイクウイルス（受託番号：NC__001886）の、プラス鎖RNAウイルス、

シュードウイルス科（*Pseudoviridae*）、たとえばシュードウイルス属（*Pseudovirus*）またはシレウイルス属（*Sirevirus*）の一本鎖RNAウイルス、

レオウイルス科（*Reoviridae*）、たとえば、イネ萎縮ウイルス（受託番号：RNA1：NC__003773；RNA2：NC__003774；RNA3：NC__003772；RNA4：NC__003761；RNAS：NC__003762；RNA6：NC__003763；RNA7：NC__003760；RNAB：NC__003764；RNA9：NC__003765；RNA10：NC__003766；RNA11：NC__003767；RNA12：NC__003768）の、二本鎖RNAウイルス、

たとえばアルファネクロウイルス属（*Alphanecrovirus*）、アウレウスウイルス属（*Aureusvirus*）、ベータネクロウイルス属（*Betanecrovirus*）、カーモウイルス属（*Carmovirus*）、ダイアンソウイルス属（*Dianthovirus*）、ガランチウイルス属（*Gallantivirus*）、マカナウイルス属（*Macanavirus*）、マクロモウイルス属（*Machlomovirus*）、パニコウイルス属（*Panicovirus*）、トムブスウイルス属（*Tombusvirus*）、アンブラウイルス属（*Umbravirus*）、またはゼアウイルス属（*Zeavirus*）たとえばトウモロコシえそ性条斑ウイルス（受託番号：NC__007729）を含む、トムブスウイルス科（*Tombusviridae*）の、プラス鎖RNAウイルス、または

ビルガウイルス科（*Virgaviridae*）、たとえばフロウイルス属（*Furovirus*）、ホルデイウイルス属（*Hordeivirus*）のウイルス種、たとえばオオムギ斑葉ウイルス（受託番号：RNA1：NC__003469；RNA2：NC__003481；RNA3：NC__003478）、またはペクルウイルス属（*Peculovirus*）、ポモウイルス属（*Pomovirus*）、トバモウイルス属（*Tobamovirus*）もしくはトブラウイルス属（*Tobravirus*）のウイルス種、たとえばタバコ茎えそウイルス（受託番号：RNA1：NC__003805；RNA2：NC__003811）の、プラス鎖RNAウイルス、ならびに

モノネガウイルス目（*Mononegavirales*）、特にラブドウイルス科（*Rhabdoviridae*）、たとえばオオムギ黄色条線モザイクウイルス（受託番号：KM213865）またはレタスえそ性黄色ウイルス（受託番号/標本：NC__007642/AJ867584）の、マイナス鎖RNAウイルス、

ピコルナウイルス目（*Picornavirales*）、特にセコウイルス科（*Secoviridae*）、たとえばコモウイルス属（*Comovirus*）、ファバウイルス属（*Fabavirus*）、ネポウイルス属（*Nepovirus*）、ケラウイルス属（*Cheravirus*）、サドワウイルス属（*Sadwavirus*）、セクイウイルス属（*Sequivirus*）、トラドウイルス属（*Torradovirus*）、またはワイカウイルス属（*Waikavirus*）の、プラス鎖RNAウイルス、

ティモウイルス目（*Tymovirales*）、特にアルファフレキシウイルス科（*Alphaflexiviridae*）、たとえばアレキシウイルス属（*Allexivirus*）、ロラウイルス属（*Lolavirus*）、マンダリウイルス属（*Mandarinivirus*）、またはポテックスウイルス属（*Potexvirus*）のウイルス種、ティモウイルス目（*Tymovirales*）、特にベータフレキシウイルス科（*Betaflexiviridae*）、たとえばカピロウイルス属（*Capillovirus*）、カルラウイルス属（*Carlavirus*）、シトリウイルス属（*Citriovirus*）、フォベアウイルス属（*Foveavirus*）、テポウイルス属（*Tepovirus*）、もしくはピチウイルス属（*Vitivirus*）のウイルス種の、プラス鎖RNA

A ウイルス、
ティモウイルス目 (*Tymovirales*)、特にティモウイルス科 (*Tymoviridae*)、たとえばマクラウイルス目 (*Maculavirus*)、マラフィウイルス目 (*Marafivirus*)、もしくはティモウイルス目 (*Tymovirus*) のウイルス種の、プラス鎖 RNA ウイルス、および
細菌ベクター、たとえばアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) spp. のような、たとえばアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 等。最後に、ベクターという用語はまた、ポリマーまたは脂質を用いる送達コンストラクトなどの物理的導入方法と組み合わせられて、標的細胞に線状核酸配列 (一本鎖または二本鎖) またはアミノ配列またはそれらの組み合わせを導入するための、好適な化学的輸送因子を意味する。

10

【 0 0 9 7 】

したがって、好適な送達コンストラクトまたはベクターは、ウイルスベクター、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) spp. などのヌクレオチド配列を標的細胞内に送達する生物学的手段、あるいはたとえばメソ孔シリカナノ粒子 (MSNP) などのナノ粒子、PEI (ポリエチレンイミン) ポリマー系アプローチもしくはDEAE-デキストランのようなポリマーなどのカチオン性ポリマー、または非共有結合表面へのPEI付加によるカチオン性表面形成、脂質もしくは高分子ベシクルなどの化学的送達コンストラクト、またはそれらの組み合わせを含む。脂質または高分子ベシクルは、たとえば脂質、リポソーム、脂質封入系、ナノ粒子、小核酸脂質粒子配合物、ポリマー、およびポリマーソームから選択することができる。

20

【 0 0 9 8 】

本明細書では、原核または真核細胞、好ましくは動物細胞、より好ましくは本開示の植物または植物細胞または植物物質の文脈で使用される「誘導体」または「後代」または「子孫」という用語は、そのような細胞または物質の有性生殖および無性生殖を含む自然の繁殖から生じる後代に関する。当業者には周知であるが、そのような繁殖により自然現象から生じる生物のゲノムに変異が導入される場合があり、その結果親生物または親細胞とゲノムが異なる後代または子孫が生じるが、それでもこれら後代または子孫は親組換え宿主細胞と同じ属/種に属し、同じ特徴の大半を有している。したがって、生殖または再生の際に自然現象から生じるような誘導体または後代または子孫は、本開示のこの用語に包

30

【 0 0 9 9 】

さらに、本明細書では、生物学的配列 (核酸またはアミノ酸) または分子または複合体の文脈で使用される「由来 (の) 」 「 ~ に由来する」、または「誘導体」という用語は、それぞれの配列がたとえば配列表の、またはデータベース受託番号の、またはその足場構造の基準配列に基づくこと、すなわち該配列に起源をもつことを意味するが、該基準配列はさらに配列を含んでいる場合があり、たとえばウイルスの全ゲノムまたは全ポリタンパク質コード配列を含んでいる場合があるが、ネイティブ配列「に由来する」配列は、その単離されたフラグメント1つだけ、またはそのコヒーレントなフラグメント1つだけを含む場合がある。この文脈では、cDNA分子またはRNAは、分子鋳型となるDNA配列「に由来する」といえる。したがって当業者は、基準配列「に由来する」配列を容易に画定することができ、DNAまたはアミノ酸のレベルについて配列アラインメントを行うと、該由来配列はそれぞれの基準配列と高い同一性を有し、それぞれの基準配列と共通のDNA/アミノ酸コヒーレント区分を有している (配列アラインメントで、由来配列をクエ

40

50

りとし、基準配列を相手配列としてアラインメントした所与の長さの分子について、クエリ同一性が75%よりも高い)。こうして当業者は、本明細書に記載の開示に基づき、それぞれの配列をポリメラーゼ連鎖反応等により関心対象の好適なベクター系にクローン化するか、または配列をベクター足場として用いることができる。したがって、「～に由来する」という用語は、任意の配列ではなく、それが由来する基準配列に対応する配列であるが、何らかの違い、たとえば宿主細胞内で組換えコンストラクトの複製中に自然に生じる何らかの変異は排除できないため、「～に由来する」という用語に包含される。さらに、親配列のいくつかの配列区分が、親由来の配列中で連結することがある。こうした異なる区分は、親配列に対して高い、時には100%の相同性を有することになる。当業者であれば周知であるが、本発明の人工分子複合体の配列が核酸配列として提供されると、または部分的にでも提供されると、生体内で転写され、場合によっては翻訳され、そして宿主細胞内でおそらくさらに消化され、かつ/または加工される(シグナルペプチドの切断、内因的ビオチン化その他)ので、「～に由来する」という用語は、本発明の開示で最初に用いられた配列との関連を示すものである。

10

20

30

40

50

【0100】

本明細書では、「融合物」は、タンパク質および/または1つまたは複数の非ネイティブ配列(たとえば諸部分)を含む核酸を指す場合がある。融合物は、修飾タンパク質のN末端もしくはC末端または両末端に、あるいは別ドメインとして分子内に存在することができる。核酸分子では、融合物分子は5'末端または3'末端、あるいはその間の任意の好適な位置に結合することができる。融合物は、転写および/または翻訳融合物の場合がある。融合物は、同じ非ネイティブ配列を1つまたは複数含む場合がある。融合物は、異なる非ネイティブ配列を1つまたは複数含む場合がある。融合物は、キメラの場合がある。融合物は、核酸親和性タグを含む場合がある。融合物は、バーコードを含む場合がある。融合物は、ペプチド親和性タグを含む場合がある。融合物は、部位特異的エフェクターまたは塩基エディターの細胞内局在化を提供することができる(たとえば、核標的化のための核局在化シグナル(NLS)、ミトコンドリア標的化のためのミトコンドリア局在化シグナル、葉緑体標的化のための葉緑体局在化シグナル、15小胞体(ER)保留シグナル等)。融合物は、追跡または精製に利用することができる非ネイティブ配列(たとえば、親和性タグ)を提供することができる。融合物は、ビオチンまたはalexaflores色素、シアニン3色素、シアニン5色素といった色素などの小分子であり得る。融合物は、より高いまたはより低い安定性を提供することができる。いくつかの実施形態では、融合物は、検出可能なシグナルを提供することができる部分などの検出可能標識を含む場合がある。検出可能なシグナルを提供することができる好適な検出可能標識および/または部分としては、限定ではないが、酵素、放射性同位体、特異的結合ペアのメンバー;フルオロフォア;蛍光レポーターまたは蛍光タンパク質;量子ドット等を挙げるすることができる。融合物は、FRETペア、またはフルオロフォア/量子ドットドナー/アクセプターペアのメンバーを含むことができる。融合物は、酵素を含む場合がある。好適な酵素としては、限定ではないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ベータ25ガラクトシダーゼ等を挙げるすることができる。融合物は、蛍光タンパク質を含む場合がある。好適な蛍光タンパク質としては、限定ではないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)(たとえば、アエクオリア・ビクトリア(*Aequoria victoria*)のGFP、アンギラ・ジャポニカ(*Anguilla japonica*)の由来蛍光タンパク質、またはそれらの変異体もしくは誘導體)、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、黄緑色蛍光タンパク質(たとえば、頭索動物ブランキオストマ・ランケロラクタム(*Branchedostoma lanceolatum*)のテトラマー蛍光タンパク質由来のmNeonGreen)、さまざまな蛍光および着色タンパク質を挙げるすることができる。融合物はナノ粒子を含む場合がある。好適なナノ粒子としては、蛍光もしくは発光ナノ粒子および磁気ナノ粒子、または任意選択によりナノ粒子に結合させたナノダイヤモンドを挙げるすることができる。ナノ粒子の任意の光または磁気特性または特徴を検出することができる。融合物としては、ヘリカーゼ、ヌクレアーゼ(たとえばFokI)、エンドヌクレアー

ゼ、エキソヌクレアーゼ（たとえば5'エキソヌクレアーゼおよび/または3'エキソヌクレアーゼ）、リガーゼ、ニッカーゼ、ヌクレアーゼ-ヘリカーゼ（たとえばCas3）、DNAメチルトランスフェラーゼ（たとえばDam）、またはDNAデメチラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、アセチラーゼ（たとえば限定ではなく、ヒストンアセチラーゼなど）、デアセチラーゼ（たとえば限定ではなく、ヒストンデアセチラーゼなど）、ホスファターゼ、キナーゼ、転写（補助）アクチベーター、転写（補助）因子、RNAポリメラーゼサブユニット、転写リプレッサー、DNA結合タンパク質、DNA構成タンパク質、長鎖非コードRNA、DNA修復タンパク質（たとえば、一本鎖および/もしくは二本鎖切断の修復に関わるタンパク質、たとえば塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復、NHEJ、HR、マイクロホモロジー媒介末端結合（MMEJ）、および/または代替非相同末端結合（ANHEJ）に関わるタンパク質、たとえば限定ではなく、HRレギュレーターおよびHR複合体アセンブリシグナル）、マーカータンパク質、レポータータンパク質、蛍光タンパク質、リガンド結合タンパク質（たとえばmCherryまたは重金属結合タンパク質）、シグナルペプチド（たとえばTat-シグナル配列）、標的化タンパク質もしくはペプチド、細胞内局在化配列（たとえば、核局在化配列、葉緑体局在化配列）、および/または抗体エピトープ、あるいはそれらの組み合わせを挙げることができる。

10

【0101】

「遺伝子改変（された）」または「遺伝子操作」または「遺伝子（的に）操作された」という用語は、本明細書では広義に使われ、直接的であれ間接的であれ人的に介入することで実現する核酸配列またはアミノ酸配列、標的細胞、組織、器官、または生物の任意の修飾によって、標的細胞、組織、器官、または生物の内在性遺伝物質またはトランスクリプトームまたはプロテノーム（proteinome）に影響を与えて、人的介入なしでの状態とは異なるよう合目的的に改変することを意味する。人的介入は、試験管内でも生体/植物内でも、または両方でも、実施することができる。さらなる修飾としては、たとえば、たとえば標的化タンパク質工学またはコドン最適化のための1つまたは複数の点変異、欠失、および少なくとも1つの核酸またはアミノ酸分子の1つまたは複数の挿入または欠失（相同組換えも含む）、核酸またはアミノ酸配列の修飾、あるいはそれらの組み合わせを挙げることができる。これらの用語はまた、自然界で生じる同等の配列、生物、または物質と似ているが少なくとも1つの合目的的操作ステップにより構築されている、核酸分子またはアミノ酸分子または宿主細胞または生物、たとえば植物またはその植物物質を含む。したがって本明細書では「標的化遺伝子操作」または「標的化（塩基）修飾」は、標的化してもたらされる、すなわち操作されるべき少なくとも1つの細胞、好ましくは植物細胞において所望の効果を実現するために標的細胞内の特定の位置に特定の好適な状況下でもたらされる「遺伝子操作」の結果であり、この用語は、標的化すべき配列およびそれに対応する修飾は先行配列の検討事項に基づくので、得られる修飾を、たとえば細胞のゲノムの標的部位について得られる配列情報に基づいて、かつ/または関心対象の分子ツールの標的特異性（核酸またはアミノ酸配列の認識または結合特性、相補塩基対形成等）の情報に基づいて、事前に計画できることを意味する。

20

30

【0102】

「ゲノム」という用語は、生物の各細胞、またはウイルスもしくは小器官に存在する全遺伝物質（遺伝子および非コード配列）、および/または片方の親から（一倍体）ユニットとして遺伝する染色体の完全な組を指す。本明細書で用いる「微粒子銃」という用語は、「微粒子銃形質移入」または「マイクロ粒子媒介遺伝子移入」とも呼ばれ、関心対象の核酸または遺伝子コンストラクトを含むコーティングされたマイクロ粒子またはナノ粒子を標的細胞または組織内に移入する物理的送達方法を指す。マイクロ粒子またはナノ粒子は発射物として機能し、しばしば遺伝子銃と呼ばれる好適なデバイスにより、関心対象の標的構造へ高圧で発射される。微粒子銃による形質転換では、関心対象の遺伝子で被覆された金属のマイクロ発射物を用い、この発射物を「遺伝子銃」（Sandford et al., 1987）として知られる装置によって、標的組織の細胞壁を貫通するには十

40

50

分であるが細胞死させるほどではない高速（約1500 km/h）で、標的細胞へ発射する。細胞壁が完全に除去されたプロトプラストでは、条件は論理的に異なる。少なくとも1つのマイクロ発射物表面に付着した核酸または遺伝子コンストラクトは、撃込み後に細胞内に放出され、ゲノムに組み込まれる。マイクロ発射物の加速は、高圧放電または圧縮ガス（ヘリウム）により実現される。使用する金属粒子については、毒性も反応性もなく、かつ標的細胞よりも粒径が小さいものでなくてはならない。もっとも一般的に用いられるのは金またはタングステンである。遺伝子銃および関連システムの一般的な使用方法については、メーカーや業者が多くの情報を一般公開している。

【0103】

本明細書では「ゲノム編集」と「ゲノム工学」という用語は交換可能に使用され、生命体の任意の遺伝情報またはゲノムの標的化された特異的修飾のためのストラテジーおよび技法を指す。したがって、これらの用語は、遺伝子編集だけでなく、ゲノムの遺伝子コード領域以外の領域の編集も包含する。さらに、（存在する場合は）核ならびに細胞のほかの遺伝情報の編集または工学も包含する。さらに、「ゲノム編集」および「ゲノム工学」という用語は、エピジェネティックな編集または工学、すなわち遺伝子発現における遺伝性の変化をもたらし得る非コードRNAの標的化修飾、たとえばメチル化、ヒストン修飾も包含する。

10

【0104】

本明細書では「生殖質」は、遺伝資源、またはより精密には生物のDNA、およびその物質の集合を説明する用語である。育種テクノロジーでは、生殖質という用語は、新しい植物または植物品種を作るもとなり得る遺伝物質の集まりを指すのに用いられる。

20

【0105】

本明細書では「ガイドRNA」、「gRNA」、または「シングルガイドRNA」または「sgRNA」という用語は交換可能に使用され、CRISPR RNA (crRNA) とトランス活性化crRNA (tracrRNA) との合成融合物を指し、あるいはこの用語はcrRNAおよび/またはtracrRNAのみからなる一本鎖RNA分子を指し、あるいはこの用語はcrRNA部分またはtracrRNA部分を個別に含むgRNAを指す。したがって、crRNA部分およびtracrRNA部分は、1つの共有結合したRNA分子上に必ずしも存在しなくてもよく、また2つの単体RNA分子に含まれていてもよく、それらが非共有結合的または共有結合的な相互作用により結合するかまたは結合されて、本開示のgRNAを提供することができる。本明細書では「gDNA」または「sgDNA」または「ガイドDNA」という用語は交換可能に使用され、アルゴノートヌクレアーゼと相互作用する核酸分子を指す。本明細書で開示するgRNAもgDNAも、部位特異的ヌクレアーゼと相互作用し、そして該部位特異的ヌクレアーゼをゲノム標的的部位に向けるのを支援する能力により「ガイドする核酸」または「ガイド核酸」と呼ばれる。

30

【0106】

本明細書では、「変異」と「修飾（改変）」という用語は交換可能に使用されて、生体内または試験管内の核酸操作の文脈で、欠失、挿入、付加、置換、編集、鎖切断、および/またはアダクトの導入を指す。欠失は、1つまたは複数のヌクレオチドが欠けた核酸配列の変化と定義される。挿入または付加は、1つまたは複数のヌクレオチドの追加をもたらした核酸配列の変化である。「置換」または編集は、ある分子で1つまたは複数のヌクレオチドを置き換えることで生じ、この分子は、置き換えられた1つまたは複数のヌクレオチドとは異なる分子である。たとえば、チミンをシトシン、アデニン、グアニン、またはウリジンで置換する例示のように、ある核酸を別の核酸で置き換えてもよい。ピリミジンからピリミジン（たとえば、CからTまたはTからCのヌクレオチド置換）またはプリンからプリン（たとえば、GからAまたはAからGのヌクレオチド置換）は転位と呼ばれるが、ピリミジンからプリンまたはプリンからピリミジン（たとえば、GからT、またはGからC、またはAからT、またはAからC）は転換と呼ばれる。かわりに、チミンをチミングリコールで置換する例示のように、核酸を修飾核酸で置換する場合もある。変異の

40

50

結果、ミスマッチが生じ得る。ミスマッチという用語は、2つの核酸間の非共有結合的相互作用を指し、各核酸は、塩基対形成ルールに従わない異なるヌクレオチド配列または核酸分子に存在する。たとえば、部分相補配列 5' - A G T - 3' と 5' - A A T - 3' には、G - A ミスマッチ（転位）が存在する。

【 0 1 0 7 】

配列または分子に関する「ヌクレオチド」と「核酸」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、天然または合成の一本鎖または二本鎖 DNA または RNA を指す。したがって、ヌクレオチド配列という用語は、長さに関係なくあらゆる DNA または RNA 配列に用いられるので、この用語は少なくとも1つのヌクレオチドを含むあらゆるヌクレオチド配列を包含するが、あらゆる種類のもっと大きいオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドも包含する。したがって、この用語は、天然および/または合成デオキシリボ核酸 (DNA) および/またはリボ核酸 (RNA) 配列を指し、任意選択により合成核酸アナログ (analog) を含むことができる。本開示の核酸は、任意選択によりコドン最適化されていてもよい。「コドン最適化」とは、DNA または RNA のコドンの使用を、関心対象の細胞または生物のものに合わせて、関心対象の細胞または生物における該組換え核酸の転写率を高めることを意味する。当業者には周知のように、コドン縮重により標的核酸の1つの位置を修飾することができるが、この修飾は翻訳後もその位置に同じアミノ酸配列を生じさせることになり、このことは、標的細胞または生物の種特異的コドンの使用を考慮したコドン最適化により実現される。本願の核酸配列は、以下に挙げる非限定的な生物について、特定のコドン最適化を担持することができる：ホルデウム・ウルガレ (*Hordeum vulgare*)、ソルガム・ビコロ (*Sorghum bicolor*)、セカレ・ケアレ (*Secale cereale*)、サッカラム・オフィシナリウム (*Saccharum officinarium*)、ゼア・メイズ (*Zea mays*)、セタリア・イタリク (*Setaria italica*)、オリザ・サチウ (*Oryza sativa*)、オリザ・ミヌタ (*Oryza minuta*)、オリザ・アウストラリエンシス (*Oryza australiensis*)、オリザ a / ta (*Oryza a / ta*)、トリチカム・アエスチウム (*Triticum aestivum*)、トリチカム・デュラム (*Triticum durum*)、トリチカレ (*Triticale*)、ホルデウム・バルボサム (*Hordeum bulbosum*)、ブラキポジウム・ジスタキオン (*Brachypodium distachyon*)、ホルデウム・マリナム (*Hordeum marinum*)、アエギロプス・タウスキイ (*Aegilops tauschii*)、Ma / us ドメスチカ (*Malus domestica*)、ベタ・ウルガリス (*Beta vulgaris*)、ヘリアンthus・アヌウス (*Helianthus annuus*)、ダウカス・グロキジアタス (*Daucus glochidiatus*)、ダウカス・プシルス (*Daucus pusillus*)、ダウカス・ムリカタス (*Daucus muricatus*)、ダウカス・カロタ (*Daucus carota*)、ユーカリプタス・グランジス (*Eucalyptus grandis*)、エリトランテ・グッタータ (*Erythranthe guttata*)、ゲンリセア・アウレア (*Genlisea aurea*)、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ・トメントシホルミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・ベンタミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ソラナム・ノイコペルシカム (*Solanum nopersicum*)、ソラナム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、コフエア・カネフォラ (*Coffea canephora*)、ウイティス・ウイニフェラ (*Vitis vinifera*)、ククミス・サチウス (*Cucumis sativus*)、マルス・ノタビリス (*Marus notabilis*)、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、アラビドプシス・リラタ (*Arabidopsis lyrata*)、アラビドプシス・アレノサ (*Arabidopsis arenosa*)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ (*Crucihimalaya*

10

20

30

40

50

a himalaica)、クルキヒマラヤ・ワリキイ (Crucihimalaya walliichii)、カルダミネ・フレクスオサ (Cardamine flexuosa)、レピジウム・ウイルギニカム (Lepidium virginicum)、カペセラ・ブルサーパストリス (Capsella bursa-pastoris)、オルマラビドプシス・プミラ (Olmara bidopsis pumila)、アラビス・ヒルスタ (Arabis hirsuta)、ブラシカ・ナプス (Brassica napus)、ブラシカ・オレラケア (Brassica oleracea)、ブラシカ・ラパ (Brassica rapa)、ブラシカ・ユンカケア (Brassica juncea)、ブラシカ・ニグラ (Brassica nigra)、ラファヌス・サチウス (Raphanus sativus)、エルカ・ウェシカリア・サチウ (Eruca vesicaria sativa)、シトラス・シネンシス (Citrus sinensis)、ジャトロファ・クルカス (Jatropha curcas)、グリキネ・マクス (Glycine max)、ゴシピウム (Gossypium) spp.、ポプラス・トリコカルパ (Populus trichocarpa)、ムス・ムスクルス (Mus musculus)、ラタス・ノルウェギクス (Rattus norvegicus) またはホモ・サピエンス (Homo sapiens)。

【0108】

したがって本明細書では、「ヌクレオチド」は、広く塩基 - 糖 - リン酸の組み合わせを指すことができる。ヌクレオチドは、合成ヌクレオチドを包含することができる。ヌクレオチドは、合成ヌクレオチドアナログを包含することができる。ヌクレオチドは、モノマー単位の核酸配列の場合がある (たとえば、デオキシリボ核酸 (DNA) およびリボ核酸 (RNA))。ヌクレオチドという用語は、リボヌクレオシド三リン酸、アデノシン三リン酸 (ATP)、ウリジン三リン酸 (UTP)、シトシン三リン酸 (CTP)、グアノシン三リン酸 (GTP)、およびデオキシリボヌクレオシド三リン酸、たとえば dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP、またはそれらの誘導体を包含することができる。そのような誘導体としては、たとえば限定ではなく、[S]dATP、7-デアザ-dGTP および 7-デアザ-dATP、ならびにそれが含まれる核酸分子にヌクレアーゼ抵抗性を付与するヌクレオチド誘導体を挙げることができる。本明細書ではヌクレオチドという用語は、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (ddNTP) およびそれらの誘導体を指す場合がある。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の例示的な例としては、限定ではないが、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、および ddTTP を挙げることができる。ヌクレオチドは無標識であってもよいし、周知の技法により標識してもよい。標識化は量子ドットを用いて実施することもできる。検出可能な標識としては、たとえば、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、バイオ発光標識、および酵素標識を挙げることができる。ヌクレオチドの蛍光標識としては、限定ではないが、フルオセイン、5-カルボキシフルオセイン (FAM)、2'-7'-ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオセイン (JOE)、ローダミン、6-カルボキシローダミン (R6G)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン (TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン (ROX)、4-(4-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABCYL)、Cascade Blue、オレゴングリーン、テキサスレッド、シアニン、および 5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸 (EDANS) を挙げることができる。

【0109】

本明細書では、「非ネイティブ」または「自然に生じない」または「人工」は、ネイティブ核酸またはタンパク質には見当たらない核酸もしくはポリペプチド配列、またはピオチンもしくはフルオセインのような任意のほかの生体分子を指す場合がある。非ネイティブは、親和性タグを指す場合がある。非ネイティブは、融合物を指す場合がある。非ネイティブは、変異、挿入および/または欠失を含む、自然に生じる核酸またはポリペプチド配列を指す場合がある。非ネイティブ配列は、それが融合している核酸および/またはポリペプチド配列も示すことのできる活性 (たとえば、酵素活性、メチルトランスフェラー

ゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性、その他)を示しかつ/またはコードすることができる。非ネイティブ核酸またはポリペプチド配列を、自然に生じる核酸またはポリペプチド配列(またはそのバリエーション)に遺伝子工学により結合させて、キメラ核酸、および/またはキメラ核酸をコードするポリペプチド配列、および/またはポリペプチドを作製することができる。「非ネイティブ配列」は、3'ハイブリダイズ伸長配列を指す場合がある。

【0110】

本明細書では、植物の細胞、組織、器官、または植物の文脈で用いられる「植物毒」または「植物毒性」という用語は、一般に植物または任意の植物細胞に対する細胞毒作用または細胞毒性を指す。したがってこの用語は、植物の細胞、組織、器官、または植物体を阻害し、破壊し、ときには殺す、化合物またはトリガの対植物毒性作用を意味する。そのようなダメージの原因は、除草剤、駆除剤、微量金属、病原菌が誘導する毒性エフェクター、塩性植物毒、またはアレロケミカルといった多様な化合物であり得る。さらに、この用語はまた、植物フィtohormon、たとえば、限定ではないが、植物の免疫応答を調節するエチレン、ジャスモン酸、およびサリチル酸のようなホルモン、または植物の発生および成長を調節するオーキシン、アブシジン酸(ABA)、サイトカイニン、ジベレリン、およびブラシノステロイドなどの植物ホルモンを指す。

10

【0111】

本明細書では、「植物」という用語は、植物体、植物器官、分化および未分化植物組織、植物細胞、種子、ならびにそれらの誘導体および子孫を指す。「植物細胞」としては、限定ではなく、たとえば、種子、成熟および未成熟胚、分裂組織、苗、異なる分化状態のカルス組織、葉、花、根、茎、配偶体、胞子体、花粉および小胞子、プロトプラスト、大型藻類および微細藻類などの細胞が挙げられる。種々の植物細胞は、一倍体、二倍体、またはマルチプロイドであり得る。「植物器官」という用語は、植物の形態的および機能的に明確な部分を構成する植物組織または植物組織群を指す。

20

【0112】

本明細書では「植物物質」は、任意の発生ステージの植物から得ることができる任意の物質を指す。植物物質は、植物内でも、植物またはその植物組織または植物器官の試験管内培養でも得ることができる。したがってこの用語は、植物の細胞、組織、および器官、ならびに発生した植物構造、ならびに核酸のような細胞内構成要素、ポリペプチド、そして植物細胞もしくはコンパートメント内に存在し得る、および/または植物が産生し得る、またはあらゆる発生ステージのあらゆる植物細胞、組織、もしくは植物の抽出物から得ることができるあらゆる植物化学物質または代謝物を包含する。この用語はまた、植物物質に含まれる少なくとも1つの植物細胞に由来する植物物質誘導体、たとえばプロトプラストを包含する。したがってこの用語は、植物の分裂細胞または分裂組織も包含する。

30

【0113】

「プラスミド」は、二本鎖核酸配列の形態の環状自己複製型染色体外エレメントを指す。遺伝子工学分野では、こうしたプラスミドは、抗菌剤または除草剤に対する抵抗性をコードする遺伝子、標的核酸配列や局在化配列、制御配列、タグ配列をコードする遺伝子、マーカー遺伝子、たとえば抗菌マーカーもしくは蛍光マーカー等を挿入することにより、日常的に標的化修飾に供されている。複製起点のようなプラスミド本来の構造構成要素は維持される。本発明の特定の実施形態では、局在化配列は、核局在化配列、プラスチド局在化配列、好ましくはミトコンドリア局在化配列または葉緑体局在化配列を含み得る。該局在化配列は、植物バイオテクノロジー分野の当業者であれば入手可能である。関心対象の種々の標的細胞に用いられるさまざまなプラスミドベクターが市販されており、その改造は各分野の当業者には公知である。

40

【0114】

「ポリメラーゼ連鎖反応」(PCR)は、特定のDNAセグメントを合成するための技法である。PCRは、一連の反復的な変性、アニーリング、および伸長サイクルで構成される。一般に、二本鎖DNAを熱変性させ、標的セグメントの3'境界に対し相補である

50

2つのプライマーを低温でDNAにアニールさせてから、中温で伸長させる。この3つの連続するステップの1セットを「サイクル」と呼ぶ。

【0115】

「子孫」は、植物、植物細胞、または植物組織の任意の次の世代を包含する。

【0116】

本明細書では「制御配列」という用語は、関心対象の核酸配列の転写および/または翻訳および/または修飾を指令することができる核酸またはアミノ酸配列を指す。

【0117】

本明細書では「タンパク質」、「アミノ酸」、または「ポリペプチド」という用語は交換可能に使用され、触媒酵素機能または構造的または機能的効果を有するアミノ酸配列を指す。「アミノ酸」または「アミノ酸配列」または「アミノ酸分子」という用語は、あらゆる天然のまたは化学合成されたタンパク質、ペプチド、ポリペプチドおよび酵素、または修飾タンパク質、ペプチド、ポリペプチドおよび酵素を包含し、ここで「修飾(された)」という用語は、タンパク質、ペプチド、ポリペプチドおよび酵素のあらゆる化学的または酵素的修飾を包含し、野生型配列をもっと短いが活性は保持している部分に切断することも包含する。

10

【0118】

本発明では、従来分子生物学、微生物学、および当技術分野の組換えDNA技法を使用する場合がある。そのような技法は、文献に詳しく説明されている。たとえば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1989) Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (本明細書では「Sambrook et al., 1989」); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985); Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)などを参照されたい。

20

30

【0119】

本明細書では、「選択(可能な)表現型」または「表現型選択(可能)」または「表現型選抜(可能)」は、成長、代謝、植物毒(たとえば除草剤)またはほかの化合物に対する感応性、または栄養分の消費についての細胞または生物の性能または外観的特徴の改変を表す。「選択(可能な)表現型」はまた、肉眼でまたは特殊装置を用いて観察した場合の可視または不可視の外観を包含する。したがって、表現型選択形質は、少なくとも1つのゲノム領域によりコードされ、顕微鏡で目視して、または分子生物学もしくは分析生物学の任意の手段により選抜することができる表現型を生じる。

40

【0120】

本開示が核酸またはアミノ酸配列の相同性または同一性の百分比に関する場合はいつでも、そのような値は、核酸はEMBOSS Water Pairwise Sequence Alignments(ヌクレオチド)プログラム(www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html

50

)、またはアミノ酸配列はEMBOSS Water Pairwise Sequence Alignments (タンパク質)プログラム(www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/)により得られたものとする。欧州分子生物学研究所(EMBL)欧州バイオインフォマティクス研究所(EBI)がローカル配列アラインメント用に提供しているこれらのツールは、修正Smith-Watermanアルゴリズム(www.ebi.ac.uk/Tools/psa/およびSmith, T.F. & Waterman, M.S. "Identification of common molecular subsequences" Journal of Molecular Biology, 1981 147 (1): 195-197を参照)を用いる。アラインメントを実施する場合、EMBL-EBIが定めるデフォルトのパラメータを用いる。そのようなパラメータは、(i)アミノ酸配列:マトリックス=BLOSUM62、ギャップ開始ペナルティ=10、ギャップ伸長ペナルティ=0.5、または(ii)核酸配列:マトリックス=DNAfull、ギャップ開始ペナルティ=10、ギャップ伸長ペナルティ=0.5である。

10

20

30

40

50

【0121】

「鎖切断」という用語は、二本鎖核酸配列、たとえばDNA標的配列としてのゲノム配列に関して使用する場合、一本鎖切断および/または二本鎖切断を包含する。一本鎖切断(ニック)は、二本鎖核酸配列の2本の鎖のうち1本の切断に関する。これに対し二本鎖切断とは、二本鎖核酸配列の両方の鎖の切断を指す。本開示の鎖切断は、CRISPRエンドヌクラーゼまたはそのバリエーションなどの好適なエンドヌクラーゼを用いて関心対象の核酸塩基位置を酵素切断することにより、二本鎖核酸配列に導入することができ、ここで該バリエーションは、野生型タンパク質の酵素機能をなおも発揮できる、野生型タンパク質またはエンドヌクラーゼの変異または短小バージョンであってもよい。

【0122】

本明細書では「標的領域」、「標的部位」、「標的構造」、「標的コンストラクト」、「標的核酸」、または「標的細胞/組織/生物」、または「DNA標的領域」という用語は、標的細胞の任意のコンパートメント内の任意のゲノム領域またはエピゲノム領域であり得る標的を指す。

【0123】

本明細書では、「標的化(された)」または「部位特異的」または「部位指定」という用語は、修飾すべき関心対象のゲノム領域の配列情報を用いる分子生物学的作用を指し、この作用はさらに、分子ツール、たとえばヌクラーゼ、たとえばCRISPRヌクラーゼおよびそのバリエーション、TALEN、ZFN、メガヌクラーゼ、またはリコンビナーゼ、DNA修飾酵素、たとえばシチジンデアミナーゼ酵素やヒストン修飾酵素などのような塩基修飾酵素、DNA結合タンパク質、cr/tracrRNA、ガイドRNA等の作用機構の情報に依存し、それによって関心対象のゲノム標的領域でもたらすべき少なくとも1つの修飾のコンピューター予測が可能になる。したがって、関連の分子ツールを試験管内またはコンピューターで設計し構築することができる。

【0124】

本明細書では、「導入遺伝子」または「トランスジェニック」という用語は、ある生物のゲノムから採取された、または合成により生産された少なくとも1つの核酸配列を指し、それが関心対象の宿主細胞または生物または組織に導入され、続いて「安定」形質転換または形質移入アプローチにより宿主のゲノムに組み込まれる。これに対し「一過性」形質転換または形質移入または導入という用語は、好適な化学物質または生物学的剤を任意選択により含む少なくとも1つの核酸(DNA、RNA、一本鎖または二本鎖、またはそれらの混合)および/または少なくとも1つのアミノ酸配列を含む分子ツールを導入して、関心対象の少なくとも1つの細胞コンパートメント、たとえば限定ではないが細胞質、小器官、たとえば核、ミトコンドリア、液胞、葉緑体、または膜内への移入を実現する方法に関し、導入された該少なくとも1つの分子の転写および/または翻訳および/または会合および/または活性が、安定組込みまたは組入れを実現することなく、したがって細

胞のゲノムに導入されたそれぞれの該少なくとも1つの分子が遺伝することなく、得られる。

【0125】

したがって、本明細書では「一過性導入」という用語は、好ましくは送達ベクターまたは組換えコンストラクトに組み入れられた、本開示の少なくとも1つの核酸配列を、送達ベクターに補助されてまたは補助なしで、標的構造たとえば植物細胞に一過的に導入することに関し、該少なくとも1つの核酸配列は、標的構造に内在する核酸物質つまり全ゲノムには組み込まれないような好適な反応条件で導入されるので、標的細胞の内在DNAには組み込まれない。したがって、一過性導入の場合、導入された遺伝子コンストラクトは、標的構造、たとえば原核細胞、動物細胞、または植物細胞の子孫には遺伝しない。該少なくとも1つの核酸配列またはその転写もしくは翻訳から生じる産物は、構造的または誘導性の形態で一時的に、すなわち一過的にしか存在しないので、標的細胞中で限られた時間だけ活性をもち効果を発揮することができる。したがって、一過性導入により導入された少なくとも1つの核酸配列は、細胞の子孫には遺伝しない。しかし、一過的に導入された核酸配列の効果は、標的細胞の子孫に遺伝する可能性がある。

10

【0126】

本明細書で開示する任意の部位特異的エフェクターまたは塩基エディターの「バリエーション」とは、自然に生じる野生型酵素の活性を変えるためにそれぞれの野生型酵素と比べて少なくとも1つの変異、欠失、または挿入を含む分子のことである。「バリエーション」は、非現定例として、触媒活性のないCas9(dCas9)または部位特異的ヌクレアーゼの場合があり、これはニッカーゼとして機能するように改変されている。

20

【0127】

発明の詳細な説明

本発明は、植物の細胞、組織、器官、または物質における標的化編集の方法を提供し、これらの方法は用途に合わせて組み合わせられ、平行導入ストラテジーを用いる。したがって、本明細書で提供する方法は、表現型選択形質を第1のゲノム標的部位に平行導入することに依拠し、この表現型選択形質そのものが容易な選抜を可能にするので、トランスジェニックマーカー配列またはマーカーカセットの導入を含まない。また、標的化修飾を第1のゲノム標的部位に導入して選択表現型を得ることは、外来性ポリヌクレオチド鋳型の提供にも標的部位の二本鎖(ds)切断の導入にも頼らないが、これらのステップはふつう、部位特異的ヌクレアーゼ(SSN)を用いてゲノム標的部位の二本鎖切断を導入するさまざまなゲノム編集アプローチで必要とされ、切断はたいてい相同修復(HR)の修復鋳型を外来性核酸物質として与えられて回復する。

30

【0128】

したがって植物育種ストラテジーに特化した諸方法が提供されているが、農学的関心対象の諸形質を関心対象の植物内で組み合わせなくてはならず、それにはふつう、繰り返しの多い時間のかかる選択ステップを要する。さらに、本明細書で提供する具体的な方法ステップは、異なるゲノム標的部位におけるトランスジェニックマーカーを用いない選択と標的化編集とを平行化し、その結果として選択可能なまたはほかの表現型が植物または植物細胞に付与される。このことはさらに、そのような改変植物物質を選択マーカーカセットを用いず単離することを可能にするが、この表現型の選択は、ふつうはそれ自体が表現型選抜可能ではない関心対象の第2の標的化修飾の選抜コストを大幅に削減する。このように2つの標的化修飾の同時導入が相乗的に相互作用して、一方の修飾はトランスジェニックマーカーを用いない選択を保証し、第2の修飾により関心対象のゲノム標的部位に高部位特異的で予測可能な編集を導入できるので、本発明の方法は、関心対象の遺伝子型を特定する選択労力が大幅に軽減された精密育種ストラテジーを可能にし、ひいては関心対象の植物細胞または生殖質における関連の修飾の特定に必要な時間とコストの削減にも役立つ。

40

【0129】

第1の態様では、少なくとも1つの改変植物細胞、または該少なくとも1つの改変植物

50

細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカ配列を安定的に組み込むことなく単離する方法を提供し、該方法は、(a) 改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾を導入することであって、該少なくとも1つの標的化塩基修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；(b) 該改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第2の標的化修飾を該第2の植物ゲノム標的部位に作成する少なくとも1つの部位特異的エフェクターを用いて導入され、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、または該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つの子孫細胞、組織、器官、もしくは植物に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および(c) (i) 該少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾により該第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた該少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに(ii) 該第2の植物ゲノム標的部位の該少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つの子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、を含む。

【0130】

本発明の方法では、選択マーカとして用いられるトランスジェニック外来性配列の安定組込みを必要としない。かわりに、第1の植物ゲノム標的部位に表現型選択形質または表現型を作成する。これには、選択時にマーカとして用いられる外来性核酸コンストラクトの組込みに頼らない、選択編集を提供するという利点がある。

【0131】

本明細書では「表現型選択形質」は、関連のゲノム形質の発現後に目視でまたは別途選択可能な表現型を生じさせる、少なくとも1つの遺伝子によりコードされる形質を指す。該形質の選択は、目視で、または植物細胞、組織、器官、物質、または植物体に与えられる選択因子、化合物、もしくはトリガを用いて、達成することができる。

【0132】

第1の植物ゲノム標的部位と第2の植物ゲノム標的部位は、同じゲノム座位であっても異なるゲノム座位であってもよい。好ましくは、第1の植物ゲノム標的部位と第2の植物ゲノム標的部位は、異なるゲノム座位に存在し、これらのゲノム座位は同じ染色体上にあっても異なる染色体上にあってもよい。

【0133】

本発明の方法では、第1の標的化修飾と第2の標的化修飾との平行導入ストラテジーをとり、第1の植物ゲノム標的部位と第2の植物ゲノム標的部位に異なる標的化修飾を導入するこの平行化により、後の選抜ステップが大きく改善される。ふつう、この第2の修飾は選択には使われない。それは、第2の修飾が付与する表現型は、植物を作製するプロセスでは発現しないか関連がないためである。したがって、本発明の方法の根底にある目的は、表現型選択表現型を生じさせる第1の修飾を、選択を可能にするツールとして用いることである。従来の方法と比べて、本明細書で開示する方法は、トランスジェニックマーカ遺伝子を組み入れない利点を有する。選択表現型を選択因子とともに用いない場合と比べると、植物生産細胞の大部分を占めることになる無処理細胞のすべてまたは大半が排除されることで、効率が上がる利点を有する。無処理細胞を排除することで、生産しなければならない植物の数が大幅に減り、そして第2の標的化修飾について分子選抜しなければならない植物の数も大幅に減り、したがって本開示の植物育種法の効率が上がることになる。

【0134】

好ましくは、本発明のさまざまな態様の方法は、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾、コドン欠失、またはフレームシフトもしくは欠失修飾を、関心対象の第2の植物ゲノ

ム標的部位に少なくとも1つの第2の標的化修飾も受ける同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、同時にまたは連続して導入することに依拠する。したがって、第1の標的部位および第2の標的部位の修飾は、好ましくは、同じ細胞に同じときに、すなわち同時に、すなわち平行して導入される。したがって、この意味で、連続導入は、少なくとも1つの塩基編集複合体および/または少なくとも1つの部位特異的エフェクターを含んで導入される異なるツールの一方が他方よりも少し早く作用し得ることを指す。とはいえ、この文脈での「連続して」という用語は、関心対象のツールを同じ細胞内に平行して同時に導入することを意味する。そしてこのことは、少なくとも1つの第1および第2の標的化修飾を媒介する分子ツールの導入プロセスが対になっていて、これらの修飾が互いに完全には独立していないことから、選抜の可能性を向上させる効果を有する。したがって、1つの修飾を有する改変すべき細胞は、第2の標的化修飾も有する可能性がかなり高い。処理済みと無処理の細胞の総合集団から細胞を無作為に、特にふつう明確な表現型をもたない第2の修飾について選択する場合と比べて、本発明の方法は選択の利点を提供する。ふつうはゲノム編集時のボトルネックとなるそれぞれのツールの機能的な送達、同期して同時に実施されるため、選択は大幅に改良される。第1の修飾を標的化して選択することが可能なので、第2の植物ゲノム標的部位の少なくとも1つの標的化修飾の選抜回数は少なく済むが、それは、本発明のどのツールまたは複合体も機能的に受けなかった細胞は、第1の植物ゲノム標的部位で表現型選択形質をもたらず修飾を受けていないからである。そのような植物細胞が、細胞に平行して加えられた本発明の第2の部位特異的エフェクター複合体を受けた可能性は低いので、第1の標的化修飾の選抜が陰性であった場合は、時間のかかる選抜を第2の標的化修飾について実施する必要がない。

【0135】

したがって本発明の方法は、第1の標的化修飾により標的化された表現型選択形質を好適な試薬または目視選抜により選択することによって、少なくとも1つの第1の修飾を受けた、または受けなかった細胞を選択することを可能にする。したがって、この選抜により少なくとも1つの第1の修飾を含まない細胞が排除され、あるいはこの選抜により細胞を目視検査して第1の標的化修飾を受けた改変細胞と第1の標的化修飾を受けなかった細胞に分離することが可能になる。本発明の平行導入および送達アプローチにより、第1の標的化修飾を成功裏に受けた細胞のうち妥当な数が、少なくとも1つの第2の標的化修飾も受けたと考えられる。「妥当な」はこの文脈では、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾により生じた少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、少なくとも1つの第2の標的化修飾の存在について選抜すべき細胞数の何らかの改善、すなわち減少を意味する。少なくとも1つの第2の標的化修飾の存在の実際の頻度は、いくつかの要因により変わり得るので、ふつうは予測しにくい。そのせいで、ゲノム工学により導入される任意の修飾を、一般的な分子技法により、たとえばPCRを利用して選抜することが煩雑になる。本発明の方法では、第1と第2の両方の標的化修飾を受けた細胞の頻度は、第1の修飾を有する植物細胞または植物と、第1および第2の標的化修飾を有する植物細胞または植物とを比べると、2:1から1000:1の範囲であり得る。したがって、第2の修飾について選抜しなくてはならない細胞の総数が減るので、どの選抜または選択ステップにおいても本質的に有利である。特に、第1および第2の標的化修飾を導入する各ツールが送達されなかった細胞は、分子ツールをいっさい受けていないと考えられるので、第1の標的化修飾も第2の標的化修飾も存在し得ない。したがって第1の表現型選択形質は識別されず、すなわち選択できない。各ツールが平行導入されているため、第1の修飾が存在しない場合は第2の修飾が導入された可能性は低いので、選択圧の下、または目視で選択後、表現型選択形質が「陰性」である植物細胞、組織、器官、または植物体は、次の第2の標的化修飾の選抜に供する必要がない。

【0136】

所望により、由来植物との交配により第1の修飾を除去し、第2の修飾から遺伝学的に分離してもよい。

【0137】

10

20

30

40

50

したがって、本明細書で開示する方法は、関心対象の少なくとも1つの第1の標的化修飾について選抜して、編集試薬を受けなかったか標的化修飾されなかった細胞を排除または除去することにより、関心対象の第2の遺伝子に標的化修飾を有する植物の回収率を高めるのに用いることができる。

【0138】

本発明のさまざまな実施形態の標的化塩基修飾は、dsDNA主鎖切断またはドナー鑄型を必要とせず、プログラム可能な様式で1つの標的DNA塩基を別の塩基に直接不可逆的に変換することを可能にするゲノム編集を指す(Komor et al., Nature, 2016, Vol. 533を参照)。

【0139】

一実施形態では、本発明の第1の態様の方法は、さらに、ステップ(b)において、少なくとも第2の植物ゲノム標的部に標的化配列変換または置換を作成するために修復鑄型を導入することを含む。修復鑄型(RT)は一本鎖または二本鎖の核酸配列であり、二本鎖または一本鎖DNA切断を生じさせる任意のゲノム編集に、相同性指定修復を支援する既知の配列の鑄型として与えられて、該DNA切断の標的化修復を支援することができる。本発明の少なくとも1つの修復鑄型核酸配列の一部としてのサイズはさまざまであり得る。それは、部位指定的に修飾すべきDNA標的配列により、約20bpから約5000bpまたは8000bpの範囲であり得る。RTは、単独の物理的要素として、または本発明の複合体の一部として与えることができる。特定の用途では、細胞のNHEJ修復機構による望ましくない挿入や欠失を回避するために、RTの使用が好ましい場合がある。

【0140】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、本明細書で提供する方法は、少なくとも1つの第1の標的化修飾および少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得るステップであって、任意選択により、該関心対象の遺伝子型は、該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、さらなるステップ(d)を含む。

【0141】

関心対象のさらなる植物または植物物質は、関心対象のゲノム物質を含むどのような植物物質であってもよく、たとえば関心対象のエリート事象または任意の形質を含むこの物質は、たとえば育種の後続ラウンドで関心対象の遺伝子型を作ること、したがって関心対象の植物を作ることが意図されている。したがって、関心対象の遺伝子型は、異なる関心対象の植物の形質を組み合わせた先行育種ステップの結果である。

【0142】

本発明の全態様の一実施形態では、関心対象の最終遺伝子型は、少なくとも1つの第1の標的化修飾、すなわち少なくとも1つの表現型選択形質を含まない。図1に例示するように、本発明の方法は、特定の用途で所望される場合、由来植物との交配により、表現型選択形質を生じさせる第1の標的化修飾を除去し、第2の標的化修飾から遺伝学的に分離することに特に適している(図1C参照)。別の実施形態では、得られた関心対象の遺伝子型および対応する植物または植物物質にとって表現型選択形質そのものが価値ある場合は、関心対象の表現型選択形質をコードする第1の標的化修飾は、関心対象の遺伝子型内に維持される場合がある。

【0143】

本発明の第1の態様の一実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、少なくとも1つの塩基編集複合体に一時的または恒久的に結合しており、該塩基編集複合体は、ステップ(a)の少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾を媒介する。したがって、少なくとも1つの部位特異的エフェクターを、非共有結合的(一時的)または共有結合的(恒久的)に、少なくとも1つの塩基編集複合体に連結させることができる。少なくとも1つの塩基編集複合体の任意の構成要素を、少なくとも1つの部位特異的エフェクター

10

20

30

40

50

に一時的または恒久的に結合させることができる。したがって、「一時的(に)」または「恒久的(に)」という用語は、広義に解釈すべきであり、少なくとも1つの部位特異的エフェクターと少なくとも1つの塩基編集複合体との物理的近さを得るための共有結合的および/または非共有結合的な結合または連結を含む。少なくとも1つの塩基編集複合体の少なくとも1つの構成要素と、少なくとも1つの部位特異的エフェクターとの結合、または任意のほかの構成要素、たとえば少なくとも1つの部位特異的エフェクターと結合したgRNAまたはRTとの結合は、少なくとも1つの第1のゲノム標的部位と少なくとも1つの第2のゲノム標的部位とが、関心対象のゲノム内で至近である場合は、関心対象であり得る。

【0144】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクターは、CasもしくはCpf1ヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノートヌクレアーゼ、FokIもしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼを含むヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または2部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、または塩基エディター、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも1つから選択される。

【0145】

したがって、本明細書では「部位特異的エフェクター」は、一本鎖または二本鎖切断をゲノム標的部位に導入する能力のある、あるいは点変異、挿入、または欠失などの標的化修飾を関心対象のゲノム標的部位に導入する能力のある、任意のヌクレアーゼ、ニッカーゼ、リコンビナーゼ、または塩基エディターと定義することができる。少なくとも1つの「部位特異的エフェクター」は単体で、または分子複合体の一部としてほかの分子と一緒に、作用することができる。「部位特異的エフェクター」は、融合分子として存在する場合もあるし、部位特異的エフェクター複合体の各構成要素が物理的に近づくように共有結合的もしくは非共有結合的相互作用の少なくとも1つにより結合したまたは結合された単体分子として存在する場合もある。

【0146】

本明細書では「塩基エディター」は、タンパク質、または由来タンパク質と同じ触媒活性をもつフラグメントを指し、該タンパク質またはそのフラグメントは、単独で、または分子複合体として提供された場合に、本明細書では塩基編集複合体と呼ばれ、標的化塩基修飾を媒介する、すなわち関心対象の塩基を変換して関心対象の点変異をもたらす能力があり、この塩基変換が、サイレント変異ではなく、塩基エディターにより変換されるべき位置を含むコドンによりコードされるアミノ酸の変換をもたらす場合、標的化変異をもたらすことができる。好ましくは、本発明の少なくとも1つの塩基エディターは、一時的または恒久的に少なくとも1つの部位特異的エフェクターに結合するか、任意選択により少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体の構成要素に結合する。この結合は、共有結合的および/または非共有結合的であり得る。

【0147】

本明細書で開示する塩基エディターもしくは部位特異的エフェクター、またはその触媒活性フラグメント、あるいは塩基エディター複合体のまたは部位特異的エフェクター複合体の構成要素はどれでも、核酸フラグメントとして細胞に導入することができ、該核酸フラグメントは、DNA、RNA、またはタンパク質エフェクターであるかそれをコードしており、あるいはDNA、RNA、および/またはタンパク質、またはそれらの任意の組み合わせとして導入することができる。

【0148】

エンドヌクレアーゼ、DSB、および修復鋳型を用いて選択修飾を作成する要件を排除する主要なツールセットは、塩基エディターまたは標的化変異誘発ドメインの使用である。複数の発表文献が、シチジンデアミナーゼドメイン、アポリポタンパクBmRNA-編集触媒ポリペプチド(APOBEC1)、たとえばラット由来のAPOBECと結合させ

10

20

30

40

50

たCRISPR/Cas9ニッカーゼまたは非機能的ヌクレアーゼを用いた、主にシチジン(C)からチミン(T)への標的化塩基変換を公表している。シトシン(C)は、シチジンデアミナーゼの触媒により脱アミノ化されて、チミン(T)の塩基対形成特性をもつウラシル(U)となる。公知のシチジンデアミナーゼの大半がRNAで機能し、DNAを認容する数例は一本鎖(ss)DNAを要する。dCas9標的DNA複合体の研究によると、Cas9-ガイドRNA-DNA「Rループ」複合体の形成後、置換DNA鎖の少なくとも9ヌクレオチド(nt)が対形成していない(Jore et al., Nat. Struct. Mol. Biol., (2011) 18, 529-536)。実際、Cas9 Rループ複合体の構造において、置換DNA鎖のプロトスペースの最初の11ntに乱れがあり、これらの移動が厳しく制限されていないことがわかる。また、非鋳型鎖のシトシンのCas9ニッカーゼ誘導変異は、それらが細胞のシチジンデアミナーゼ酵素によりアクセスされやすいため生じる可能性が考えられる。発明者らは、RループのこのssDNA区分のサブセットは、dCas9とつながったシチジンデアミナーゼにとって、DNAにおいてCからUへのプログラム可能な直接の変換をもたらす効率のよい基質の役割を果たし得ると推論した(Komor et al., 前掲)。

10

20

30

40

50

【0149】

したがって、本発明のどの塩基編集複合体も、少なくとも1つのシチジンデアミナーゼ、またはその触媒活性フラグメントを含む場合がある。少なくとも1つの塩基編集複合体は、シチジンデアミナーゼ、または触媒活性フラグメントの形態でそのドメインを、塩基エディターとして含む場合がある。

【0150】

別の実施形態では、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、ヌクレオチドC、A、T、またはGのいずれかの、任意のほかのヌクレオチドへの変換である。C、A、T、またはGヌクレオチドのいずれか1つを、塩基エディターまたはその触媒活性フラグメントの媒介により、部位指定的に別のヌクレオチドに交換することができる。したがって、少なくとも1つの塩基編集複合体は、任意の塩基エディター、または塩基エディタードメイン、またはその触媒活性フラグメントを含むことができ、関心対象のヌクレオチドを、任意のほかの関心対象のヌクレオチドに、標的化して変換することができる。

【0151】

本発明は、塩基エディターツールそのものについての知識を組み合わせる方法を提供し、この技術に関心対象の表現型選択表現型を得るための併用法として用いて、トランスジェニックマーカーの必要性を回避するが、それは選択可能な表現型アウトプットを有する内在性マーカーを塩基編集により人工的に作成できるからである。そのために、塩基エディターは、ゲノム標的領域を認識し結合する能力を保持している改変された部位特異的エフェクターと組み合わせられ、場合によってはCRISPRベースのヌクレアーゼのgRNAにガイドされて、CからUまたはGからAへの変換を媒介して、部位指定的変異誘発を導入する。そうして標的化変異を発生させることができ、関心対象の表現型が得られる。こうして標的化育種ストラテジーが可能になるが、特に、本明細書で開示する方法ではさらに、改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に標的化塩基修飾を導入するための少なくとも1つの塩基エディターまたは塩基編集複合体の使用と、少なくとも1つの部位特異的エフェクターが媒介する第2の修飾とを平行的に組み合わせる。このアプローチにより、マーカーを用いない選択と、関心対象の修飾または遺伝子型の選抜とが相乗効果的に可能になり、本発明のさまざまな態様の少なくとも1つの第1の修飾、すなわち標的化塩基修飾、標的化コドン欠失、または標的化フレームシフトもしくは欠失修飾のために、DSBまたはRTの導入を必要としない。

【0152】

ウラシルDNAグリコシラーゼ(UGI)ドメインを付加することで、塩基編集効率がさらに上がる。複合体が適切に標的化できるように、核局在化シグナル(NLS)、または任意のほかの小器官標的化シグナルがさらに必要になる場合がある。

【0153】

本発明の全態様の一実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクターは、CRISPRベースのヌクレアーゼであり、該CRISPRベースのヌクレアーゼは、少なくとも1つの塩基編集複合体を導く部位特異的DNA結合ドメインを含み、該少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、(a) SpCas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、VQR-Cas9、St1Cas9を含む、Cas9、(b) Ascpf1、LbCpf1、FnCpf1を含む、Cpf1、(c) CasX、および(d) CasY、ならびに前述のCRISPRベースのヌクレアーゼの任意のパリアントおよび誘導体を含む群より選択され、好ましくは該少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたCRISPRベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的DNAニッカ

10

【0154】

本明細書では「CRISPRベースのヌクレアーゼ」は、自然に生じるCRISPR系において同定されている任意のヌクレアーゼであり、その後その自然のコンテキストから単離され、好ましくは標的化ゲノム工学の好適なツールになるように、改造されまたは組み合わされて関心対象の組換えコンストラクトにされている。オリジナルの野生型CRISPRベースのヌクレアーゼがDNA認識性すなわち結合特性を提供するが、どのCRISPRベースのヌクレアーゼを用いてもよく、任意選択により、本発明のさまざまな実施形態にとって好適であるようにリプログラムしたり、さらに変異させたりすることができる。該DNA認識性は、PAM依存的であり得る。特殊用途用に最適化され工学されたPAM認識パターンを有するCRISPRヌクレアーゼを使用しかつ作製することができる。野生型CRISPRベースのヌクレアーゼのオリジナルのPAM特異性とは関係なく、部位特異的エフェクター複合体を関心対象の標的部位に向けるために、PAM認識コードの伸長が好適であり得る。Cpf1パリアントは、アシダミノコッカス(*Acidaminococcus*)のAscpf1のS542R、K548V、N552R、またはK607R変異のうち少なくとも1つを含むことができ、好ましくは変異S542R/K607RまたはS542R/K548V/N552Rを含む(配列番号24参照)。さらに、本発明の方法では塩基編集複合体の一部として、改変Casパリアント、たとえばCas9パリアント、たとえばBE3、VQR-BE3、EQR-BE3、VREB-BE3、SaBE3、SaKKH-BE3を用いることができる(Kim et al., Nat. Biotech., 2017, doi:10.1038/nbt.3803を参照)。したがって、本発明では、人工的に改変したCRISPRヌクレアーゼを想定し、これらは二本鎖切断酵素という意味においてはとくに「ヌクレアーゼ」ではないかもしれないが、なおも固有のDNA認識性を有し、したがって結合能力がある、ニッカ

ーゼまたはヌクレアーゼデッドパリアントである。本発明の目的にとって好適な例示的CasベースまたはCpf1ベースのコンストラクトを、配列番号17~19に開示する。Ascpf1野生型配列を配列番号24に開示する。本発明の方法で使用されるほかの好適なCpf1ベースのエフェクターは、ラクノスピラ科バクテリア(*Lachnospiraceae bacterium*)由来(LbCpf1、たとえば、NCBI基準配列:WP_051666128.1)、またはフランシセラ・ツラレンシス(*Francisella tularensis*)由来(FnCpf1、たとえば、UniProtKB/Swiss-Prot:A0Q7Q2.1)である。Cpf1のパリアントが公知である(Gao et al., BioRxiv, dx.doi.org/10.1101/091611を参照)。そこで、本発明の部位特異的エフェクターとして想定されるのは、試験管内および生体内で高い活性を有し、TYCV/CCCとTATVのPAMを有する標的部位をそれぞれ切断できる変異S542R/K607R、およびS542R/K548V/N552Rを有するAscpf1のパリアントである。ゲノム全体にわたるオフターゲット活性の評価によると、これらのパリアントは高レベルのDNA標的化特異性を保持しているが、非PAM相互作用ドメインに変異を導入することで、該特異性

20

30

40

50

をさらに高めることができる。これらのバリエーションを合わせると、A s C p f 1の標的化範囲は、ヒトゲノムの非反復領域でおよそ8.7bpごとに1つの切断部位にまで増大し、CRISPR/Casゲノム工学のツールボックスにとっての便利な追加項目となる(前掲のGaoretal.を参照)。

【0155】

本発明の第1の態様の一実施形態では、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、少なくとも1つの塩基エディターを構成要素として含む少なくとも1つの塩基編集複合体により作成される。本発明の塩基編集複合体は、塩基エディターのほかにもさらなる任意選択の構成要素を含む。

【0156】

一実施形態では、塩基編集複合体は、APOBEC1構成要素、好ましくはラットAPOBEC1を含む。別の実施形態では、塩基編集複合体は、塩基エディターとして、任意のシチジン/シトシデアミナーゼ酵素、たとえばヒトAID、たとえばUniProtKB/Swiss-Prot:Q9GZX7.1、ヒトAPOBEC3G、たとえばGenBank:CAK54752.1、またはヤツメウナギCDA1、たとえばGenBank:ABO15150.1を含む場合があるが、本発明の範囲ではあらゆる酵素またはその触媒活性フラグメントが想定される。本発明の方法での使用に適した例示的APOBEC構成要素を、配列番号20に示す。さらに、本発明の方法では、改変された塩基エディター、好ましくは6nt未満の、5nt未満の、4nt未満の、3nt未満の、または2ntの、もしくは1ntの狭い編集幅を有する塩基エディターを使用することができる。編集ウィンドウが狭いほど、関心対象のゲノム標的部位により精密な編集を導入することができる。

【0157】

一実施形態では、塩基編集複合体は、UGI(ウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤)構成要素を含む。特定の実施形態では、バチルス・スプチリス(Bacillus subtilis)由来のUGIを使用する場合があり、またはUDGの活性を阻害して特定の細胞において活性のある内在性塩基除去修復(BER)の活性を抑制する任意のほかのドメインを使用する場合がある。本発明の方法での使用に適した例示的UGI構成要素を、配列番号21に示す。

【0158】

さらなる実施形態では、塩基編集複合体は、XTEN構成要素、すなわち少なくとも1つの部位特異的エフェクターに結合した少なくとも1つの塩基エディターの最適な脱アミノ化活性を提供するための特殊なリンカーを含む。塩基エディターと部位特異的エフェクターの間に少なくとも2ヌクレオチド(nt)長のほかのリンカーを用いる場合もあるが、部位特異的エフェクターが付与する結合活性および/または塩基エディターの塩基編集活性に影響はない。好適なXTENリンカー配列を、配列番号1(位置688~735)、配列番号2(位置706~753)、配列番号14(位置706~753)、または配列番号15(位置706~753)に示す。さまざまなさらなるリンカーが当業者には公知であり、リンカー設計の文献もある。したがって、リジッドなリンカーでもフレキシブルなリンカーでも本発明のさまざまな方法で用いることができる。

【0159】

本発明の例示的融合コンストラクトを、配列番号1、2、14、15、または16に示す。

【0160】

一実施形態では、少なくとも1つの塩基編集複合体は2つ以上の構成要素を含み、少なくとも2つ構成要素は物理的に結合している。物理的な結合には、共有結合的な結合、たとえばDNAフラグメントを互いに融合させて、発現後に融合タンパク質を生成させること、または本開示の複合体の異なる構成要素を互いに化学架橋することが含まれ得る。物理的な結合にはまた、非共有結合的相互作用が含まれ得る。したがって非共有結合的相互作用または連結には、静電相互作用、ファンデルワールス力、TT作用、および疎水性作

10

20

30

40

50

用が含まれる。核酸分子の文脈で特に大切なのは、静電相互作用としての水素結合である。水素結合（H結合）は特殊なタイプの双極子間相互作用であり、部分的にプラスの水素原子と、この水素原子と共有結合するのではない、電気陰性度が高い、部分的にマイナスの酸素、窒素、硫黄、またはフッ素原子との相互作用が関与している。

【0161】

さらなる実施形態では、塩基編集複合体は、PmCDA1（ウミヤツメウナギの活性化誘導シチジンデアミナーゼ（AID）オルソログPmCDA1、Nishida et al. (Science 2016, vol. 353, issue 6305, aaf8729) 参照）構成要素を塩基エディターとして含む。本発明の方法で用いられる例示的PmCDA1を、配列番号22に示す。

10

【0162】

CRISPRベースのヌクレアーゼは、修飾すべき関心対象のゲノム標的領域に存在するプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の認識を通じて作用する。したがって、改変されたCRISPRベースのヌクレアーゼを用いた塩基編集の範囲および精度をさらに増大するために、異なるPAM特異性を導入して標的化できる部位の数を増やすことは、大きな関心事項である（Kim et al., Nat. Biotech., 2017, doi:10.1038/nbt.3808）。当業者には公知のように、各種野生型CRISPRヌクレアーゼは、ヌクレアーゼごとに異なる固有のPAM特異性を有する。本発明で想定するCRISPRベースのヌクレアーゼは、改変されたPAM特異性を有するので、標的化範囲も改変されており、たとえば、NGAPAM配列を許容するSpCas9変異体（VQR-Cas9）、NGAGPAM配列を許容するSpCas9変異体（EQR-Cas9）、またはNGCGPAM配列を許容するSpCas9変異体（VRRR-Cas9）、ならびにパリアントのPAM要件をNNNRRTに緩める3種の変異を含む工学SaCas9パリアント（SaKKH-Cas9）である（Kleinstiver et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33, 1293-1298）。異なるCRISPRベースのヌクレアーゼに適した本発明の例示的PAM配列を配列番号3～13および23に示す。

20

【0163】

一実施形態では、少なくとも1つの塩基編集複合体は、2つ以上の構成要素を含み、少なくとも2つの構成要素は単体の構成要素として与えられる。このアプローチは、特定の形質転換または形質移入ストラテジーにとって好適であり得る。

30

【0164】

本発明の方法の特定の実施形態では、細胞内で複合体が形成できるよう、または形質転換もしくは形質移入前に試験管内で複合体が形成できるよう、本発明の任意の複合体の少なくとも1つの構成要素が、関心対象の細胞内で同系の結合パートナーと特異的に相互作用または結合することができる部または部分を含む場合がある。結合ペアは、ドッキングドメイン、またはアソシエーションドメイン、またはそれをコードする核酸配列により結合することができ、ピオチン、アプタマー、DNA、RNA、またはタンパク質色素、たとえばフルオロフォア、たとえばフルオセイン、もしくはそのパリアント、マレイミド、またはTetraxolium（XTT）、少なくとも1つの修復鋳型核酸配列と相互作用するように特異的に構成されているガイド核酸配列、ストレプトアビジン、もしくはそのパリアント、好ましくはモノマーのストレプトアビジン（streptavidin）、アビジン、もしくはそのパリアント、親和性タグ、好ましくはストレプトアビジンタグ、抗体、単鎖可変フラグメント（scFv）、所与の抗体もしくはscFvに特異的な抗原、シングルドメイン抗体（ナノボディ）、アンチカリン、アグロバクテリウムVirD2タンパク質もしくはそのドメイン、ピコルナウイルスVPg、トポイソメラーゼもしくはそのドメイン、PhiX174ファージAタンパク質、PhiX A*タンパク質、VirE2タンパク質もしくはそのドメイン、またはジオキシゲニンの少なくとも1つから選択される。ほかの好適な結合ペアが当業者には公知である。もっとも好ましくは、同系結合パートナーは、生理学的条件下で、互いに高い親和性定数または結合親和性を有し、し

40

50

たがって低い解離定数 (K_d) を有し、すなわち K_d 値は低 μM であり、または好ましくは nM 範囲であり、好ましくはそれよりも低く、本発明の少なくとも1つの塩基編集複合体または少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体の複合体形成を支援する。

【0165】

本発明の全態様の一実施形態の方法では、少なくとも1つの塩基編集複合体の少なくとも1つの構成要素、および/または少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体の少なくとも1つの構成要素は、該少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けるために少なくとも1つの小器官局在化シグナルを含む。一実施形態では、少なくとも1つの小器官局在化シグナルは、核局在化シグナル (NLS) である。さらなる実施形態では、少なくとも1つの小器官局在化シグナルは、葉緑体輸送ペプチドである。さらなる実施形態では、少なくとも1つの小器官局在化シグナルは、ミトコンドリア輸送ペプチドである。1つまたは複数の局在化シグナルは、塩基編集複合体または部位特異的エフェクター複合体の少なくとも1つの構成要素と結合した状態で存在することができる。

10

【0166】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、少なくとも1つの表現型選択形質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位の少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する。

20

【0167】

本明細書では「成長優位性」は、植物の発生および生殖の全ステージにおける任意の生理学的または代謝的に好ましい特性、たとえば生物学的および非生物学的ストレスに対する抵抗性が有利である、またはたとえば乾燥や塩度等のようなストレス条件下での植物の成長および発生に影響する特性を指す。

【0168】

したがって本発明では「化合物」または「トリガ」は除草剤であり得、たとえば、細胞代謝阻害剤、たとえば：EPS阻害 (グリシン、たとえばグリホサート)；ALS/AHAS (分枝鎖アミノ酸産生) 阻害 (たとえばイミダゾリン、スルホニルウレア)；脂質合成阻害/Accase (アリアルオキシフェノキシプロピオネート (FOP)、シクロヘキサジオン (DIM)、フェニルピラゾリン (DEN)；グルタミンシンターゼ阻害剤 (グルホシネート/ホスフィノスリチン (phosphinotricin))、成長/細胞分裂阻害剤、たとえば植物細胞成長攪乱剤 (フェノキシカルボン酸、たとえば2,4-D)、合成オーキシシン (安息香酸たとえばジカンバ)、オーキシシン輸送阻害 (フタラマート)；および光合成干渉、たとえば：漂白剤/HPD阻害剤 (ピラゾールおよびイソキサゾール)；光化学系II阻害剤 (PSII阻害剤) (トリアジン、トリアジノン、ピリダゾン、C3：アイオキシニルおよびプロモキシニルほか多数)；プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害剤 (PPO/PPX) (たとえばジフェニルエーテルおよびN-フェニルフトアルイミド) から選択される。

30

【0169】

さらに、本発明では「化合物」または「トリガ」は、植物内部で生じるまたは外部から加えられる、植物の代謝に影響する植物成長因子または任意のほかの物質の場合もある。

40

【0170】

本明細書で開示する方法の全実施形態で、化合物またはトリガは、外部から加えられて、関心対象の形質、少なくとも1つの植物細胞、組織、器官、物質、または植物体によりコードされる、そして本発明の全態様のさまざまな方法で標的化されて修飾されている表現型選択形質の選択を可能にする。したがって、表現型選択形質の修飾の形態の特異的相互作用ペアを提供すること、ならびに対応する化合物およびトリガを後続の選択および交配のステップで提供することで、あらゆる育種の取り組みを改善することができる。

【0171】

50

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、関心対象の少なくとも1つの表現型選択形質は、少なくとも1つの内在性遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、あるいは関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、少なくとも1つの内在性遺伝子または少なくとも1つの導入遺伝子は、関心対象の少なくとも1つの表現型形質に少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速度、胚発生のブースターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される。

10

【0172】

本発明のさまざまな態様のさらなる実施形態では、少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位は、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むE P S P S阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むA L SまたはA H A S阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリーロキシフェノキシプロピオネート(F O P)を含むA C C a s e阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド生合成阻害剤、4-ヒドロキシフェニル-ピルビン酸-ジオキシゲナーゼ(H P P D)阻害剤、またはほかのカロテノイド生合成標的の阻害剤を含むカロテノイド生合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系I電子ダイバーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系I I阻害剤に対する抵抗性/耐性、P P O阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンバ(2, 4-D、すなわち2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシシンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される。

20

【0173】

本発明のさまざまな態様のさらなる実施形態では、少なくとも1つの内在性遺伝子または少なくとも1つの導入遺伝子は、ウイルス、細菌、真菌、もしくは動物の病原菌から選択される病原菌抵抗性/耐性などの生物的ストレスに対する抵抗性/耐性、非生物的ストレスに対する抵抗性/耐性、たとえば冷害抵抗性/耐性、乾燥ストレス抵抗性/耐性、浸透圧抵抗性/耐性、熱ストレス抵抗性/耐性、低温ストレス抵抗性/耐性、酸化ストレス抵抗性/耐性、重金属ストレス抵抗性/耐性、塩ストレスもしくは浸水抵抗性/耐性、倒伏抵抗性/耐性、脱粒抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、収量増、開花期改変、種子色改変、胚乳組成の改変、栄養分改変、または関心対象の経路の代謝工学などのさらなる関心対象の農学的形質の修飾からなる群より選択される。

30

【0174】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの表現型選択形質は、植物毒抵抗性/耐性形質、好ましくは除草剤抵抗性/耐性形質であり、改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位の少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、植物毒化合物、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性を付与し、該化合物は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体、またはその子孫に加えられる外来性化合物である。

40

【0175】

関心対象の植物細胞のゲノムによりコードされる任意のさらなる表現型選択形質を、本発明のさまざまな態様の少なくとも1つの第1の標的化修飾の標的とすることができるが、ただし、関心対象の表現型選択形質をコードする少なくとも1つの遺伝子が既知であること、および対応する相補性の化合物またはトリガが入手可能であるかまたは標的化修飾

50

を選抜できるように設計可能であることが前提である。可視表現型の場合、選抜用の化合物またはトリガは不要であるが、かわりに目視で選抜可能な形質の観測に基づいた好適な読み取りおよび決定ストラテジーを準備する必要がある。

【0176】

さまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、除草剤または植物毒化合物に対する抵抗性または耐性を付与する遺伝子であり、第1の植物ゲノム標的部位は、少なくとも1つの対応するアミノ酸変換を生じさせる少なくとも1つの核酸変換を含み、少なくとも1つの核酸変換は、少なくとも1つの塩基エディターにより作成されている。

【0177】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、ALSである。本発明の目的には、どのALS配列でも好適である。例示的ALS配列を配列番号25に示す。

【0178】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、PPOである。本発明の目的には、どのPPO配列でも好適である。例示的PPO配列を配列番号26に示す。

【0179】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、EPSPSである。本発明の目的には、どのEPSPS配列でも好適である。例示的EPSPS配列を配列番号27に示す。

【0180】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、EPSPS、ALS、またはPPO、またはそれらの任意のアレルもしくは植物バリエーションであり、EPSPS、ALS、またはPPOは、少なくとも1つの対応するアミノ酸変換をもたらす少なくとも1つの核酸変換を含み、少なくとも1つの核酸変換は、少なくとも1つの塩基エディターにより作成されている。

【0181】

本発明の表現型選択形質をコードするそのような一標的は、5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ(EPSPS)遺伝子である。いくつかの1または2アミノ酸置換により、該酵素のグリホサート感受性が低下することがわかっている(Sammons, R. D. and Gaines, T. A. (2014), Glyphosate resistance: state of knowledge. Pest. Manag. Sci., 70: 1367-1377)。

【0182】

別の標的は、アセト乳酸シンターゼ(ALS)遺伝子であり、さまざまな1アミノ酸変異が、トリアゾロピリミジン、スルホニルウレア、ピリミジニルチオベンゾアート、イミダゾリノン、およびスルホニルアミノカルボニルトリアゾリノンといった分類に属する1つまたは複数の除草剤に対する耐性と関連付けられている。本発明の目的に適した残基置換としては、A122、P197、A205、D376、W574、およびS653が挙げられる。

【0183】

さらに別の選択修飾は、ゼア・メイズ(Zea mays)およびアラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana)のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(PPO)遺伝子における。ここで、215番目のシステインのフェニルアラニンへ(A215F)、ロイシンへ(A215L)、またはリジンへ(A215K)の修飾、ならびに220番目のアラニンのバリンへ(A220V)、スレオニンへ(A220T)、またはロイシンへ(A220L)の修飾、ならびに221番目のグリシンのセリンへ(A221S)またはロイシンへ(A221L)の修飾は、ジフェニルエーテル、N-フェニルフトアルイミド、オキサジアゾール、オキサゾリジンジオン、フェニルピラゾール、

10

20

30

40

50

ピリミジニジオン、チアジアゾール、トリアゾリノン、その他などのPPO除草剤に対する抵抗性を指す(Li, Xianggan et al. "Development of Protoporphyrinogen Oxidase as an Efficient Selection Marker for *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize." *Plant Physiology* 133.2 (2003): 736-747. PMC. Web. 2017年3月15日)。上記の残基置換に加えて、N.タバカム(N. tabacum)またはそのホモログの178番目のグリシンの1アミノ酸欠失は、PPO阻害剤の結合を妨害し、上記阻害剤に対する抵抗性を与える(Patzoldt, W. L. et al. (2006). "A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase" *PNAS* 103(33): 12329-12334)ので、本発明のさまざまな態様で用いることができる。

10

【0184】

さらに、本願に記載の技術は、精密なアミノ酸修飾および欠失のみならず、選択表現型を生じさせる遺伝子の配列を修飾または妨害するための終止コドンの導入を可能にする。アミノ酸をコードする61のコドンのうち、どちらかの鎖の少なくとも1つのシトシン/シチジンからチミン/チミジンへの変換により、5つのアミノ酸を終止コドンに変換することができる。

20

【0185】

これらの修飾を作成するツールは、CRISPRヌクレアーゼそのものである。1つまたは複数の塩基対欠失を提供することがわかっているCRISPRヌクレアーゼとしては、Cas9、Cpf1、CasX、およびCasYが挙げられる。これらは現時点ではもっとも便利なオプションであるが、将来開発される部位指定ヌクレアーゼも、本文書に記載する手順に容易に適応できよう。

【0186】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位はALSであり、標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてA122をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてP197をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてA205をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてD376をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてR377をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてW574をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてS653をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号25のALS基準配列と比べてG654をコードする配列に生じ、あるいは前述の変異の任意の組み合わせである。

30

【0187】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位はPPOであり、標的化修飾は配列番号26のPPO基準配列と比べてC215、A220、G221、N425、またはY426をコードする配列に生じ、あるいは前述の変異の任意の組み合わせである。

40

【0188】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、選択の目的で、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位は、アマランサス・ツベルクラタス(*Amaranthus tuberculatus*)のPPX2L遺伝子産物である。本発明のさまざまな態様の一実施形態では、標的化塩基修飾、標的化コドン欠失、または標的化フレームシフトもしくは欠失修飾を含む第1の標的化修飾は、配列番号28のアマランサス・ツベルクラタス(*Amaranthus tuberculatus*)のPPX2L遺伝子産物のG2

50

10 残基に相当する位置に生じる。

【0189】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位はE P S P Sであり、少なくとも1つの標的化修飾が、配列番号27のE P S P S基準配列と比べてG 1 0 1、T 1 0 2、P 1 0 6、G 1 4 4、またはA 1 9 2をコードする配列に生じる標的化修飾のいずれか1つであり、あるいは前述の変異の任意の組み合わせである。特定の好ましい実施形態では、標的化修飾は配列番号27のE P S P S基準配列と比べてG 1 0 1およびG 1 4 4をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号27のE P S P S基準配列と比べてG 1 0 1およびA 1 9 2をコードする配列に生じ、または標的化修飾は配列番号27のE P S P S基準配列と比べてT 1 0 2およびP 1 0 6をコードする配列に生じる。

10

【0190】

当業者であれば、本明細書に記載の開示に基づいて、本発明の少なくとも1つの表現型選択形質を作るためのさらなる好適な植物毒抵抗性/耐性形質および対応する変異を定義することもできる。

【0191】

本発明のさまざまな態様の特定の実施形態では、少なくとも1つの表現型選択形質は、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体を特定または単離するのに便利な可視表現型である。「可視」表現型は、肉眼であれ顕微鏡であれ、目で観測して検出できる任意の表現型なので、分子生物学的選抜が不要になる。

20

【0192】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、少なくとも1つの表現型選択形質は光沢表現型、ゴールド表現型、着色表現型、または成長優位性表現型である。いくつかのほかの可視表現型が当業者には公知である。これらの可視表現型は、関心対象の植物または植物細胞の遺伝的背景により異なる。

【0193】

本発明の第2の態様では、少なくとも1つの改変植物細胞、または該少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカ配列を安定的に組み込むことなく単離する方法を提供し、該方法は、(a) 改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に、ヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、またはDNA修飾試薬を含む少なくとも1つの第1の部位特異的エフェクターを用いて、少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾を導入することであって、該少なくとも1つの標的化コドン欠失修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；(b) 該改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第2の標的化修飾を該第2の植物ゲノム標的部位に作成する少なくとも1つの第2の部位特異的エフェクターを用いて導入され、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、または該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および(c) (i) 該少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾により該第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた該少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに(ii) 該第2の植物ゲノム標的部位の該少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、(d) 任意選択により、該少なくとも1つの第1の標的化修飾および該少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得ることであ

30

40

50

って、任意選択により、該関心対象の遺伝子型は、該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、交配させること、を含む。

【0194】

本発明のさらなる態様では、少なくとも1つの改変植物細胞、または該少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカ配列を安定的に組み込むことなく単離する方法を提供し、該方法は、(a)改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第1の部位特異的エフェクターを用いて、少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾を導入することであって、該少なくとも1つの標的化フレームシフトまたは欠失修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；(b)該改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第2の標的化修飾を該第2の植物ゲノム標的部位に作成するヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、またはDNA修飾試薬を含む少なくとも1つの第2の部位特異的エフェクターを用いて導入され、該少なくとも1つの第2の標的化修飾は、該少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、または該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物体に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および(c)(i)該少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾により該第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた該少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに(ii)該第2の植物ゲノム標的部位の該少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、(d)任意選択により、該少なくとも1つの第1の標的化修飾および該少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得ることであって、任意選択により、該関心対象の遺伝子型は、該少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、交配させること、を含む。

10

20

30

【0195】

上記で詳述したように、本発明の方法は、2つの異なる分子複合体の新たな組み合わせを提供し、1つの複合体は、トランスジェニックマーカを挿入することなく選択表現型を生じさせる少なくとも1つの第1の標的化修飾を導入するように構成されており、もう1つの複合体は、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入するように構成されており、ここで第1の修飾は選抜の目的に貢献し、第2の修飾は導入されるべきゲノム編集を表す。したがって、本発明の方法は、異なるゲノム標的部位でゲノム編集ストラテジーを相乗効果的に組み合わせる異なる標的化修飾を実現し、最終的には関心対象の遺伝子型を有する植物が得られる効率のよい育種法となる。

40

【0196】

特定の実施形態では、本発明の方法のステップbが、少なくとも1つの第1のおよび/または第2の植物ゲノム標的部位に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型(RT)を導入することをさらに含む。RTによってゲノム編集アプローチの精度レベルがさらに上がるが、それは、好適なRTを単体でまたは本発明の少なくとも1つの複合体の一部として与えることで、ヌクレアーゼまたはニッカーゼにより生じた切断を、エラーが起きやすい内在性NHEJ経路を修復機構とするのではなく、相同性指定修復を支援することにより所定のとおり修復することができるからである。一実施形態では、CRISPRベースのヌクレアーゼが、gRNAと相互作用する部位特異的エフェクターとして用いられ、該gRNAはRTに共有結合的に結合することができ、または該CRISPRベースのヌクレアーゼおよび/またはgRNAは、RTと非共有結合的に相互作用する。

50

別の実施形態では、RTは、関心対象のRTをコードするコンストラクトの追加などで単体として与えられ、該RTは、該RTの相同性アームに媒介される相補性塩基対形成により部位特異的エフェクター複合体と結合し、関心対象の少なくとも1つのゲノム標的部位にアニールする。

【0197】

一実施形態では、融合タンパク質、または相互作用ドメインとして非共有結合的に結合した活性Cpf1と不活性dCas9が、部位特異的エフェクターとして提供される場合がある。Cas9のgRNAは、修復鋳型またはその伸長部を標的とすることができ、Cpf1-dCas9-RT複合体を形成する。crRNA(Cpf1)は、二本鎖切断の対象とされたゲノム座位を標的として、HDRを開始する。同様に、高活性のジंकフィンガータンパク質、megaTAL、または不活性メガヌクレアーゼを用いることができる。

10

【0198】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、本明細書で開示する方法のいずれか1つにより得ることができる植物細胞、組織、器官、物質、もしくは植物体、またはその子孫を提供する。

【0199】

本明細書で提供する方法は、農学的に好ましい形質を有するがトランスジェニックマーカー配列を含まない新種の植物の提供を支援するように特別設計されているので、本明細書で開示する方法は、多種多様な植物遺伝子型を速く確実に作るのに適している。

20

【0200】

本発明のさまざまな態様の一実施形態では、改変すべき少なくとも1つの植物細胞は、好ましくは、ホルデウム・ウルガレ(*Hordeum vulgare*)、ホルデウム・バルバゾム(*Hordeum bulbosum*)、ソルガム・ビコロ(*Sorghum bicolor*)、サッカラム・オフィシナリウム(*Saccharum officinarium*)、ゼア・メイズ(*Zea mays*)などのゼア(*Zea*) spp.、セタリア・イタリカ(*Setaria italica*)、オリザ・ミヌタ(*Oryza minuta*)、オリザ・サチワ(*Oryza sativa*)、オリザ・アウストラリエンシス(*Oryza australiensis*)、オリザ・アルタ(*Oryza alta*)、トリチカム・アエスチウム(*Triticum aestivum*)、トリチカム・デュラム(*Triticum durum*)、セカレ・ケレアレ(*Secale cereale*)、トリチカレ(*Triticale*)、マルス・ドメスチカ(*Malus domestica*)、ブラキポジウム・ジスタキオン(*Brachypodium distachyon*)、ホルデウム・マリナム(*Hordeum marinum*)、アエギロプス・タウスキイ(*Aegilops tauschii*)、ダウカス・グロキジアタス(*Daucus glochidiatus*)、ベタ・ウルガリス(*Beta vulgaris*)などのベタ(*Beta*) spp.、ダウカス・プシルス(*Daucus pusillus*)、ダウカス・ムリカタス(*Daucus muricatus*)、ダウカス・カロタ(*Daucus carota*)、ユーカリプタス・グランジス(*Eucalyptus grandis*)、ニコチアナ・シルベストリス(*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ・トメントシホルミス(*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・タバカム(*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ・ベンタミアナ(*Nicotiana benthamiana*)、ソラナム・リコペルシカム(*Solanum lycopersicum*)、ソラナム・ツベロサム(*Solanum tuberosum*)、コフェア・カネフォラ(*Coffea canephora*)、ウイティス・ウイニフェラ(*Vitis vinifera*)、エリトランテ・グッタータ(*Erythraea guttata*)、ゲンリセア・アウレア(*Genlisea aurea*)、ククミス・サチウス(*Cucumis sativus*)、マルス・ノタビリス(*Malus notabilis*)、アラビドプシス・アレノサ(*Arabidopsis arenosa*)、アラ

30

40

50

ビドブシス・リラタ (*Arabidopsis lyrata*)、アラビドブシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ (*Crucihimalaya himalaica*)、クルキヒマラヤ・ワリキイ (*Crucihimalaya wallichii*)、カルダミネ・ネクスオサ (*Cardamine nexuosa*)、レビジウム・ウイルギニカム (*Lepidium virginicum*)、カプセラ・ブルサ・パストリス (*Capsella bursa pastoris*)、オルマラビドブシス・プミラ (*Olmarabidopsis pumila*)、アラビス・ヒルステ (*Arabis hirsute*)、ブラシカ・ナプス (*Brassica napus*)、ブラシカ・オレラケア (*Brassica oleracea*)、ブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*)、ラファヌス・サチウス (*Raphanus sativus*)、ブラシカ・ユンカケア (*Brassica juncea*)、ブラシカ・ニグラ (*Brassica nigra*)、エルカ・ウエシカリア *subsp.* サチワ (*Eruca vesicaria subsp. sativa*)、シトラス・シネンシス (*Citrus sinensis*)、ジャトロファ・クルカス (*Jatropha curcas*)、ポプラス・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*)、メジカゴ・トランカツラ (*Medicago truncatula*)、キケル・ヤマシタエ (*Cicer yamashitae*)、キケル・ビユガム (*Cicer bijugum*)、キケル・アリエチナム (*Cicer arietinum*)、キケル・レチクラタム (*Cicer reticulatum*)、キケル・ユダイカム (*Cicer judaicum*)、カヤナス・カヤニフォリウス (*Cajanus cajanifolius*)、カヤナス・スカラバエオイデス (*Cajanus scarabaeoides*)、ファセオラス・ウルガリス (*Phaseolus vulgaris*)、グリキネ・マクス (*Glycine max*)、ゴシピウム (*Gossypium*) *sp.*、アストラガラス・シニカス (*Astragalus sinicus*)、ロータス・ヤポニカス (*Lotus japonicas*)、トレニア・フォーウルニエリ (*Torenia fournieri*)、アリウム・ケバ (*Allium cepa*)、アリウム・フィストロサム (*Allium fistulosum*)、アリウム・サチウム (*Allium sativum*)、ヘリアンタス・アヌウス (*Helianthus annuus*)、ヘリアンタス・ツベロサス (*Helianthus tuberosus*) およびアリウム・ツベロサム (*Allium tuberosum*) からなる群より選択される植物または前述の植物の1つに属するあらゆる変種または亜種に由来する。

【0201】

遺伝子改変された、導入遺伝子を含まない植物を生産する方法：

さらなる態様では、本発明は、ゲノム編集により遺伝子改変植物を作製する方法を提供し、該方法は、

- a) 遺伝子改変すべき植物の細胞または組織を準備するステップ；
 - b) 第1のゲノム編集系および第2のゲノム編集系を準備するステップであって、該第1のゲノム編集系は、植物の選択マーカー遺伝子を標的化し修飾することができ、該第2のゲノム編集系は、該植物の関心対象の遺伝子を標的化し修飾することができる、ステップ；
 - c) 該第1および該第2のゲノム編集系で該細胞または該組織を同時形質転換するステップ；
 - d) 好ましくは選択圧なしで、該形質転換細胞または組織から植物を再生させるステップ；
 - e) ステップd) で再生させた植物のなかから、該選択マーカー遺伝子が修飾されている植物を選択するステップ；および
 - f) ステップe) で選択した植物のなかから、その標的遺伝子が修飾されている植物を特定するステップ
- を含む。

【0202】

植物の細胞または組織としては、インタクトな植物として再生させることができる、プロトプラスト、カルス、外植体、未成熟胚等の任意の細胞または組織が挙げられる。

【0203】

本明細書では、「遺伝子修飾（改変）」は、遺伝子の配列を変えること、および/または遺伝子の発現を変えることを包含する。

【0204】

本明細書では、「関心対象の遺伝子」という用語は、構造遺伝子も非構造遺伝子も含め、植物の修飾すべき任意のヌクレオチド配列を意味する。好ましくは、関心対象の遺伝子は、植物の形質、好ましくは農学的形質と関連がある。

10

【0205】

本明細書では、「選択マーカー遺伝子」は、植物の内在性遺伝子であって、好適に修飾された後、選択することができる選択形質を該植物に付与する遺伝子を意味する。好ましくは、選択マーカー遺伝子は、好適に修飾されたとき、植物のほかの形質を実質的に変えることはない。

【0206】

たとえば、選択マーカー遺伝子は、植物の内在性の除草剤抵抗性遺伝子であってもよく、好適に修飾されると該植物に除草剤抵抗性を付与する。植物内在性の除草剤抵抗性遺伝子としては、限定ではないが、PsbA、ALS、EPSPS、ACCase、PPO、およびHPPD、PDS、GS、DOXP、およびP450が挙げられる。除草剤抵抗性を付与することができるALS変異部位としては、限定ではないが、A122、P197、A205、およびS653が挙げられる（アミノ酸のナンバリングはアラビドプシス・タリアナ（*Arabidopsis thaliana*）のALSのアミノ酸配列を参照する）。除草剤抵抗性を付与することができるEPSPS変異部位としては、限定ではないが、T102、P106が挙げられる（アミノ酸のナンバリングはアラビドプシス・タリアナ（*Arabidopsis thaliana*）のEPSPSアミノ酸配列を参照する）。除草剤抵抗性を付与することができるACCase変異部位としては、限定ではないが、I1781、W2027、I2041、D2078、およびG2096が挙げられる（アミノ酸のナンバリングはアロペクルス・ミオスロイデス（*Allopecurus myosuroides*）の葉緑体ACCaseのアミノ酸配列を参照する）。除草剤抵抗性を付与することができるHPPD変異部位としては、限定ではないが、P277、L365、G417、およびG419が挙げられる（アミノ酸のナンバリングはイネのHPPD酵素のアミノ酸配列を参照する）。

20

30

【0207】

本発明のいくつかの実施形態では、コムギにおいて除草剤抵抗性を付与することができるALS変異部位として、TaALS P173が挙げられる。いくつかの実施形態では、トウモロコシにおいて除草剤抵抗性を付与することができるALS変異部位として、ZmALS P165が挙げられる。いくつかの実施形態では、イネにおいて除草剤抵抗性を付与することができるALS変異部位として、OsALS P171が挙げられる。

【0208】

かわりに、選択マーカー遺伝子は、適切に修飾されると目視観測できる形質変化を植物に産生させる、葉舌、葉色、葉蛾を制御する遺伝子などであってもよく、限定ではないがLIG、PDS、zb7、およびGL2が挙げられる。

40

【0209】

従来の植物改変法（トランスジェニック法）では、効率を上げるために、植物の再生時に特定の選択圧を加えることを要する（たとえば、使用される導入遺伝子ベクターに応じた異なる抗菌剤を用いた選抜）。しかし、それによって外来遺伝子、特に抗菌剤抵抗性遺伝子が植物ゲノムに組み込まれ、安全面の問題をはらむことになる。

【0210】

本ゲノム編集技術を植物改変に用いることで、本ゲノム編集系は標的の遺伝子修飾を植

50

物ゲノムに組み込むことなく実現することができる。したがって、本発明の方法では、ステップd)の再生は、好ましくは選択圧なしで実施される。こうして外来遺伝子の組み込みを回避し、遺伝子改変された(遺伝子編集された)トランスジェニック植物が得られる。しかし、選択圧なしで植物を再生させると、選抜効率が大きく低下してしまう。

【0211】

この問題は、本発明では、関心対象の遺伝子を標的とするゲノム編集系と、内在性選択マーカー遺伝子を標的とするゲノム編集系との同時形質転換により解決される。

【0212】

何ら理論にとらわれるものではないが、本発明の方法では、関心対象の遺伝子を標的とするゲノム編集系と、内在性選択マーカー遺伝子を標的とするゲノム編集系とが植物(植物細胞または組織など)に同時形質転換されると、関心対象の遺伝子および内在性選択マーカー遺伝子の編集が一緒に生じる傾向がある。したがって、内在性選択マーカー遺伝子に基づいて選択された植物は、その関心対象の遺伝子も修飾されている可能性が高い。内在性選択マーカー遺伝子編集に関する1回目の選抜は、関心対象の遺伝子編集の選抜効率を大きく向上させることになる。そして、内在性選択マーカー遺伝子しか用いないので、導入遺伝子の懸念は回避される。本発明では、好ましくは、内在性選択マーカー遺伝子は修飾後も関心対象の形質に影響せず、たとえば収量減少などは起きない。さらに好ましくは、内在性選択マーカー遺伝子の修飾により、植物にさらなる関心対象の形質、たとえば除草剤抵抗性が付与される。つまり、好ましくは、本発明で植物の選択に利用できる形質は、除草剤抵抗性などの農学的にも有用な形質である。

10

20

【0213】

ステップe)の選択を実施する方法は、選択マーカー遺伝子の性質による。たとえば、選択マーカー遺伝子が、植物に除草剤抵抗性を付与するように修飾される場合、再生された植物を、野生型選択マーカー遺伝子を有する植物が生存できないか発育不良になるような好適な濃度に置くことができる。そして、この除草剤濃度で生存するか良好に発育する植物が選択される。

【0214】

ステップf)の特定は、たとえばPCR/RE、またはシーケンシング法により実施することができる。当業者であれば、遺伝子に変異したか否かをいかにして特定するか熟知している。

30

【0215】

本発明の植物(細胞または組織)を形質転換する好適な方法としては、限定ではないが、微粒子銃、PEG媒介プロトプラスト形質転換、およびアグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介形質転換が挙げられる。

【0216】

本発明は、植物ゲノムの正確な編集ができるのであれば、特に特異的ゲノム編集系に限定しない。たとえば、本発明での使用に適したゲノム編集系としては、限定ではないが、精密塩基エディター(PBE)系、CRISPR-Cas9系、CRISPR-Cpf1系、CRISPRi系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系、およびTALEN系が挙げられる。関心対象の遺伝子および内在性選択マーカー遺伝子を標的化する好適なゲノム編集系の選定および設計は、当業者の技術範囲内である。

40

【0217】

CRISPR系は、細菌が進化する過程で生産するようになった、外来遺伝子の侵入に対する防御系である。それが改変され、真核生物のゲノム編集で広く用いられている。

【0218】

CRISPR-Cas9系とは、Cas9ヌクレアーゼに基づいたゲノムCRISPR編集系を指す。「Cas9ヌクレアーゼ」と「Cas9」は本明細書では交換可能に使用され、Cas9タンパク質またはそのフラグメント(たとえば、Cas9の活性DNA切断ドメインおよび/またはCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質)を含む、RNAに案内されるヌクレアーゼを指す。Cas9は原核生物免疫系CRISPR/Ca

50

sの構成要素であり、ガイドRNAに案内されてDNA標的配列を標的として切断してDNA二本鎖切断(DSB)を形成することができる。本発明での使用に適したCRISPR-Cas9系としては、限定ではないが、Shan, Q. et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat. Biotechnol. (2013) 31, 686-688に記載のものが挙げられる。

【0219】

「ガイドRNA」と「gRNA」は本明細書では交換可能に使用され、一般に、部分相補性により複合体を形成するcrRNA分子とtracrRNA分子とで構成され、ここでcrRNAは、標的配列とハイブリダイゼーションするのに十分相補性の配列を含み、CRISPR複合体(Cas9+crRNA+tracrRNA)を導いて該標的配列に特異的に結合させる。しかし当技術分野では、crRNAとtracrRNA両方の特徴をもつシングルガイドRNA(sgRNA)も設計できることが公知である。

10

【0220】

本発明のCRISPR-Cas9系は、以下のうちの1つを含む場合がある：

- i) Cas9タンパク質、およびガイドRNA；
- ii) Cas9タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト、およびガイドRNA；
- iii) Cas9タンパク質、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト；
- iv) Cas9タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト；または
- v) Cas9タンパク質をコードするヌクレオチド配列およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト。

20

【0221】

CRISPR-Cpf1系は、Cpf1ヌクレアーゼに基づいたCRISPRゲノム編集系である。Cpf1とCas9の違いは、Cpf1タンパク質のほうが分子量が小さく、またcrRNAだけがガイドRNAとして必要とされるほか、PAM配列も異なっている。本発明での使用に適したCRISPR-Cpf1系としては、限定ではないが、Tang et al., 2017に記載の系が挙げられる。

30

【0222】

本発明のCRISPR-Cpf1系は、以下のうちの1つを含む場合がある：

- i) Cpf1タンパク質、およびガイドRNA(crRNA)；
- ii) Cpf1タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト、およびガイドRNA；
- iii) Cpf1タンパク質、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト；
- iv) Cpf1タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト；または
- v) Cpf1タンパク質をコードするヌクレオチド配列およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト。

40

【0223】

CRISPR干渉(CRISPRi)は、ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質を用いるCRISPR-Cas9系由来の遺伝子サイレンシング系である。この系は標的遺伝子の配列を変えることはないが、本明細書ではこの系もゲノム編集系として定義する。本発明での使用に適したCRISPRi系としては、限定ではないが、Seth and Harish, 2016に記載の系が挙げられる。

【0224】

本発明のCRISPRi系は、以下のうちの1つを含む場合がある：

- i) ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質、およびガイドRNA；

50

i i)ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト、およびガイドRNA；

i i i)ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト；

i v)ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト；または

v)ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質をコードするヌクレオチド配列、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト。

【0225】

精密塩基エディター系は、CRISPR-Cas9に基づいて最近開発された系であり、Cas9タンパク質とシチジンデアミナーゼとのヌクレアーゼ不活性化融合タンパク質を用いて、正確にゲノムの1塩基編集ができる。(DNA切断ドメインのHNHサブドメインおよび/またはRuvCサブドメインの変異による)ヌクレアーゼ不活性化Cas9は、gRNA誘導DNA結合能力を保持しており、シチジンデアミナーゼがDNA上のシチジン(C)の脱アミノ化を触媒してウラシル(U)を形成することができる。ヌクレアーゼ不活性化Cas9は、シチジンデアミナーゼと融合される。ガイドRNAに案内されて、該融合タンパク質は、植物ゲノムの標的配列を標的化することができる。Cas9ヌクレアーゼ活性がないので、DNA二本鎖は切断されない。融合タンパク質のデアミナーゼドメインは、Cas9-gRNA-DNA複合体の形成で生産された一本鎖DNAのシチジンをUに変換し、CからTの置換が塩基ミスマッチ修復により得られる。本発明での使用に適した精密塩基エディター系としては、限定ではないが、Zong et al., 2017に記載の系が挙げられる。

【0226】

本発明の精密塩基エディター系は、以下のうちの1つを含む場合がある：

i)ヌクレアーゼ不活性化Cas9とシチジンデアミナーゼの融合タンパク質、およびガイドRNA；

i i)ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質とシチジンデアミナーゼの融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト、およびガイドRNA；

i i i)ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質とシチジンデアミナーゼの融合タンパク質、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト；

i v)ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質とシチジンデアミナーゼの融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト；または

v)ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質とシチジンデアミナーゼの融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む発現コンストラクト。

【0227】

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質は、野生型Cas9(Spyogenes SpCas9)と比べてアミノ酸置換D10Aおよび/またはH840Aを含む。シチジンデアミナーゼの例としては、限定ではないが、APOBEC1デアミナーゼ、活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)、APOBEC3G、またはCDA1(PmCDA1)が挙げられる。

【0228】

「ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)」は、ジンクフィンガーDNA結合ドメインとDNA切断ドメインとを融合させて調製された人工制限酵素である。1つのZFNのジンクフィンガーDNA結合ドメインは一般に3~6の個別のジンクフィンガーリピートを含み、各ジンクフィンガーリピートがたとえば3bpを認識する。本発明での使用に適したZFN系は、たとえばShukla et al., 2009およびTownse

10

20

30

40

50

nd et al., 2009から得ることができる。

【0229】

「トランスアクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)」は、特定のDNA配列を切断するように工学することができる制限酵素であり、ふつう転写アクチベーター様エフェクター (TALE) のDNA結合ドメインと、DNA切断ドメインとを融合させて調製される。TALEは、たいていの所望のDNA配列に結合するように工学することができる。本発明での使用に適したTALEN系は、たとえばLi et al., 2012から得ることができる。

【0230】

当業者であれば、本発明の方法の第1のゲノム編集系と第2のゲノム編集系の組み合わせを、異なるゲノム編集系それぞれの特徴により、また実現すべき所望の特定のタイプのゲノム編集により、適切に決定することができる。たとえば、互いの干渉、たとえば同じgRNAを共有することができる異なる系同士の干渉を避けるための好適な組み合わせを選択することができる。

10

【0231】

たとえば、選択形質を作成するのに、内在性選択マーカー遺伝子が精密変異のために1塩基編集系を必要とする場合、関心対象の遺伝子の標的化に通常はCRISPR-Cas9系を用いないが、それはこの2つの系が同じgRNAを共有することができるので、関心対象の遺伝子をノックアウトするCas9が内在性選択マーカー遺伝子もノックアウトする可能性があるからである (その逆もあり)。

20

【0232】

本発明の方法のいくつかの好ましい実施形態では、第1のゲノム編集系と第2のゲノム編集系は、どちらも精密塩基エディター系である。

【0233】

本発明のいくつかの実施形態では、第1のゲノム編集系および第2のゲノム編集系の構成要素は、同じ発現コンストラクトにより発現させても異なる発現コンストラクトにより発現させてもよく、当業者が適宜選択することができる。たとえば、関心対象の遺伝子および選択マーカー遺伝子のガイドRNAは、同じ発現コンストラクトを用いて転写されてもよい。好ましくは、第1のゲノム編集系および第2のゲノム編集系の構成要素を、同じ発現コンストラクトにより発現させる。

30

【0234】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、第1のゲノム編集系および第2のゲノム編集系はどちらも精密塩基エディター系であって、ヌクレアーゼ不活性化Cas9タンパク質とシチジンデアミナーゼと関心対象の遺伝子および選択マーカー遺伝子のガイドRNAとの融合タンパク質が、同じ発現コンストラクトにより発現させられる。

【0235】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、植物は単子葉または双子葉である。たとえば、植物は、ホルデウム・ウルガレ (Hordeum vulgare)、ホルデウム・バルバゾム (Hordeum bulbosum)、ソルガム・ビコロ (Sorghum bicolor)、サッカラム・オフィシナリウム (Saccharum officinarium)、ゼア・メイズ (Zea mays) などのゼア (Zea) spp.、セタリア・イタリカ (Setaria italica)、オリザ・ミヌタ (Oryza minuta)、オリザ・サチワ (Oryza sativa)、オリザ・アウストラリエンシス (Oryza australiensis)、オリザ・アルタ (Oryza alta)、トリチカム・アエスチウム (Triticum aestivum)、トリチカム・デュラム (Triticum durum)、セカレ・ケレアレ (Secale cereale)、トリチカレ (Triticale)、マルス・ドメスチカ (Malus domestica)、ブラキポジウム・ジスタキオン (Brachypodium distachyon)、ホルデウム・マリナム (Hordeum marinum)、アエギロプス・タウスキイ (Aegilops tauschii)、ダウカス・グ

40

50

口キジアタス (*Daucus glochidiatus*)、ベタ・ウルガリス (*Beta vulgaris*) などのベタ (*Beta*) spp.、ダウカス・プシルス (*Daucus pusillus*)、ダウカス・ムリカタス (*Daucus muricatus*)、ダウカス・カロタ (*Daucus carota*)、ユーカリプトス・グランジス (*Eucalyptus grandis*)、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ・トメントシホルミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ・ベンタミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*)、ソラナム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、コフェア・カネフォラ (*Coffea canephora*)、ウイティス・ウイニフェラ (*Vitis vinifera*)、エリトランテ・グッタータ (*Erythranthe guttata*)、ゲンリセア・アウレア (*Genlisea aurea*)、ククミス・サチウス (*Cucumis sativus*)、マルス・ノタビリス (*Marus notabilis*)、アラビドプシス・アレノサ (*Arabidopsis arenosa*)、アラビドプシス・リラタ (*Arabidopsis lyrata*)、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ (*Crucihimalaya himalaica*)、クルキヒマラヤ・ワリキイ (*Crucihimalaya wallichii*)、カルダミネ・ネクスオサ (*Cardamine nexuosa*)、レピジウム・ウイルギニカム (*Lepidium virginicum*)、カプセラ・ブルサ・パストリス (*Capsella bursa pastoris*)、オルマラビドプシス・プミラ (*Olmarabidopsis pumila*)、アラビス・ヒルスステ (*Arabis hirsute*)、ブラシカ・ナプス (*Brassica napus*)、ブラシカ・オレラケア (*Brassica oleracea*)、ブラシカ・ラパ (*Brassica rapa*)、ラファヌス・サチウス (*Raphanus sativus*)、ブラシカ・ユンカケア (*Brassica juncea*)、ブラシカ・ニグラ (*Brassica nigra*)、エルカ・ウエシカリア subsp. サチワ (*Eruca vesicaria subsp. sativa*)、シトラス・シネンシス (*Citrus sinensis*)、ジャトロファ・クルカス (*Jatropha curcas*)、ポプラス・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*)、メジカゴ・トランカツラ (*Medicago truncatula*)、キケル・ヤマシタエ (*Cicer yamashitae*)、キケル・ビュガム (*Cicer bijugum*)、キケル・アリエチナム (*Cicer arietinum*)、キケル・レチクラタム (*Cicer reticulatum*)、キケル・ユダイカム (*Cicer judaicum*)、カヤナス・カヤニフォリウス (*Cajanus cajanifolius*)、カヤナス・スカラバエオイデス (*Cajanus scarabaeoides*)、ファセオラス・ウルガリス (*Phaseolus vulgaris*)、グリキネ・マクス (*Glycine max*)、ゴシビウム (*Gossypium*) sp.、アストラガラス・シニカス (*Astragalus sinicus*)、ロータス・ヤポニカス (*Lotus japonicas*)、トレニア・フォウルニエリ (*Torenia fournieri*)、アリウム・ケパ (*Allium cepa*)、アリウム・フィスツロサム (*Allium fistulosum*)、アリウム・サチウム (*Allium sativum*)、ヘリアンタス・アヌウス (*Helianthus annuus*)、ヘリアンタス・ツベロサス (*Helianthus tuberosus*)、およびアリウム・ツベロサム (*Allium tuberosum*) からなる群より、または前述の植物の1つに属するあらゆる変種もしくは亜種から選択される。いくつかの実施形態では、植物は作物植物である。

【0236】

本発明のいくつかの実施形態では、方法は、さらに、遺伝子改変され導入遺伝子を含まない植物の子孫を得ることを含む。

10

20

30

40

50

【0237】

別の態様では、本発明はまた、遺伝子改変植物またはその子孫もしくはその一部を提供し、該植物は本発明の上記の方法により得られる。

【0238】

別の態様では、本発明はまた、本発明の上記の方法により得られた第1の遺伝子改変植物を、該遺伝子改変を含まない第2の植物と交配させ、そうすることで該遺伝子改変を該第2の植物に導入することを含む、植物育種法を提供する。

【0239】

植物の修飾すべき関心対象の遺伝子と内在性選択マーカー遺伝子とを同時に標的化することにより、遺伝子改変され導入遺伝子を含まない植物の選抜効率が大きく向上し得る。本発明の方法により、導入遺伝子を含まない変異体の選抜効率は、1%未満の変異率を有する関心対象の遺伝子について約10~100倍向上し得る。

10

【0240】

送達方法：

遺伝物質を植物細胞に導入するさまざまな好適な送達技法が当業者には公知であり、たとえばプロトプラストのポリエチレングリコール(PEG)処理(Potrykus et al., 1985)から、電気穿孔(D'Halluin et al., 1992)、微量注入(Neuhaus et al., 1987)、炭化ケイ素繊維ウイスキー技術(Kaeppler et al., 1992)、ウイルスベクター媒介アプローチ(Gelvin, Nature Biotechnology 23, "Viral-mediated plant transformation gets a boost", 684-685 (2005))、および微粒子銃(たとえば Sood et al., 2011, Biologia Plantarum, 55, 1-15を参照)のような手順まで、直接的な送達技法を選択することにより導入される。

20

【0241】

アグロバクテリウム(Agrobacterium)形質転換またはウイルスベクターが媒介する植物形質転換のような生物学的アプローチに基づいた、および微粒子銃または微量注入のような物理的送達方法に基づいた形質転換方法が、関心対象の植物細胞または組織に遺伝物質を導入する屈指の技法として発展してきたが、Helenius et al. ("Gene delivery into intact plants using the Helios™ Gene Gun", Plant Molecular Biology Reporter, 2000, 18 (3): 287-288)は、植物細胞に物質を導入する物理的方法として微粒子銃を開示している。このように、現在、関心対象の植物細胞に遺伝子コンストラクトの形態で遺伝物質を導入するさまざまな植物形質転換法が存在しており、これには植物バイオテクノロジー分野で当業者に公知の生物学的および物理的手段が含まれ、少なくとも1つの塩基エディターおよび少なくとも1つの部位特異的エフェクターならびに少なくとも1つの塩基エディターと少なくとも1つの部位特異的エフェクターとを含む対応する複合体を導入するのに用いることができる。なお、このような形質転換および形質移入の送達方法は、本発明のツールを同時導入するのに用いることができる。一般的な生物学的手段は、アグロバクテリウム(Agrobacterium) spp. を用いた形質転換であり、多種多様な植物物質で何十年も使用されている。ウイルスベクターが媒介する植物の形質転換は、関心対象の細胞に遺伝物質を導入するさらなる戦略である。植物生物学で用いられ始めた物理的手段として、微粒子銃、別名微粒子銃形質移入またはマイクロ粒子媒介遺伝子移入があり、関心対象の核酸または遺伝子コンストラクトを含む被覆マイクロ粒子またはナノ粒子を標的細胞または組織に移入する物理的送達方法を指す。物理的導入手段は、核酸、すなわちRNAおよび/またはDNA、ならびにタンパク質の導入に適している。同様に、関心対象の核酸またはアミノ酸コンストラクトを植物細胞に特異的に導入する、電気穿孔、微量注入、ナノ粒子、および細胞貫通ペプチド(CPP)などの、特異的形質転換または形

30

40

50

質移入の方法が存在する。さらに、遺伝子コンストラクトおよび/または核酸および/またはタンパク質を導入するための化学物質ベースの形質移入方法が存在し、とりわけリン酸カルシウムを用いた形質移入、リボソーム、たとえばカチオン性リボソームを用いた形質移入、DEAD-デキストランまたはポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを用いた形質移入、あるいはそれらの組み合わせが挙げられる。したがってこうした送達方法または送達ビヒクルまたはカーゴは、動物および哺乳類の細胞などのほかの真核細胞に使用される送達ツールとは本質的に異なり、どの送達方法も、ゲノム編集を媒介する関心対象のコンストラクトを完全に機能性および活性のある様式で関心対象の標的細胞の特定のコンパートメントに導入できるように、特化して微調整し最適化する必要がある。上述の送達技法を単独でまたは組み合わせて用いて、本発明の少なくとも1つの分子複合体、すなわち塩基エディター複合体および/もしくは部位特異的エフェクター複合体、または少なくとも1つのその下位構成要素、すなわち少なくとも1つのSSN、少なくとも1つのgRNA、少なくとも1つのRT、もしくは少なくとも1つの塩基エディター、または本発明の前述の下位構成要素をコードする配列を、生体内または試験管内で標的細胞に挿入することができる。

10

【0242】

本発明では物理的および化学的送達方法が特に好ましいが、それはこれらの方法が関心対象のさまざまなツールを少なくとも1つの植物細胞に同時送達すること、したがって平行導入することを可能にするからである。

【0243】

特定の実施形態では、gRNAのcrRNA部分は、ステムループまたは最適化ステムループ構造または最適化二次構造を含む。別の実施形態では、成熟crRNAが、ステムループまたは最適化ステムループ構造を直接反復配列に含み、ここでステムループまたは最適化ステムループ構造は切断活性にとって重要である。特定の実施形態では、成熟crRNAは、好ましくはシングルステムループを含む。特定の実施形態では、直接反復配列は、好ましくはシングルステムループを含む。特定の実施形態では、エフェクタータンパク質複合体の切断活性は、ステムループRNA二重構造に影響する変異の導入により修飾される。好ましい実施形態では、ステムループのRNA二重部を維持する変異が導入される場合があり、そうすることでエフェクタータンパク質複合体の切断活性が維持される。ほかの好ましい実施形態では、ステムループのRNA二重構造を破壊する変異が導入される場合があり、そうすることでエフェクタータンパク質複合体の切断活性が完全に消失する。

20

30

【0244】

なお、本発明の方法さまざまな態様の方法は、アミノ酸をコードするコード領域内の修飾としての第1および/または第2の標的化修飾に限定されない。制御配列の修飾も想定されている。エピジェネティック効果を有するあらゆる修飾もまた、本発明の方法により対処できる。

【0245】

一実施形態では、修飾すべき少なくとも1つのゲノム標的配列は、プロモーターなどの制御配列の場合があり、該プロモーターの編集には、プロモーターまたはプロモーターフラグメントを別のプロモーター（置換プロモーターともいう）または別のプロモーターフラグメント（置換プロモーターフラグメントともいう）で置換することが含まれ、該プロモーター置換の結果として以下のいずれか1つ、または以下の任意の組み合わせの1つが得られる：プロモーター活性の上昇、プロモーター組織特異性の上昇、プロモーター活性の低下、プロモーター組織特異性の低下、新しいプロモーター活性、誘導可能プロモーター活性、遺伝子発現ウインドウの拡大、同じ細胞層またはほかの細胞層における遺伝子発現のタイミングまたは発生進行の改変、たとえば薬のタペータムにおける遺伝子発現のタイミングの延長、DNA結合エレメントの変異および/またはDNA結合エレメントの欠失もしくは付加。修飾すべきプロモーター（またはプロモーターフラグメント）は、編集されている細胞に対し内在性の、人工の、既存の、またはトランスジェニックなプロモ-

40

50

ター（またはプロモーターフラグメント）である。置換プロモーターまたはそのフラグメントは、編集されている細胞に対し内在性の、人工の、既存の、またはトランスジェニックなプロモーターまたはそのフラグメントの場合がある。

【0246】

一実施形態では、少なくとも1つのゲノム標的配列は、プロモーターの場合があり、該プロモーターの編集には、ネイティブEPSPS1プロモーターを植物ユビキチンプロモーターで置換することが含まれる。別の実施形態では、修飾すべき少なくとも1つのゲノム標的配列はプロモーターの場合があり、編集すべき該プロモーターは、ゼア・メイズ（*Zea mays*）-PEPC1プロモーター（Kausch et al., *Plant Molecular Biology*, 2001 45: 1-15）、ゼア・メイズ（*Zea mays*）ユビキチンプロモーター（UBI1ZM PRO, Christensen et al., *plant Molecular Biology* 1992 18: 675-689）、イネアクチンプロモーター（McElroy et al., *The Plant Cell*, Vol 2, 163-171, 1990年2月）、ゼア・メイズ（*Zea mays*）-GOS2プロモーター（米国特許第6,504,083号明細書）、およびゼア・メイズ（*Zea mays*）オレオシンプロモーター（米国特許第8,466,341号明細書）を含む群より選択される。

10

【0247】

一実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体は、同時送達されるRTと組み合わせて用いることができ、それによって、導入遺伝子選択マーカを組み入れることなく、プロモーターまたはプロモーターエレメントを関心対象のゲノムヌクレオチド配列に挿入することが可能になり、プロモーター挿入（またはプロモーターエレメント挿入）の結果として以下のいずれか1つ、または以下の任意の組み合わせの1つが得られる：プロモーター活性の上昇、すなわちプロモーター強度の上昇、プロモーター組織特異性の上昇、プロモーター活性の低下、プロモーター組織特異性の低下、新しいプロモーター活性、誘導可能プロモーター活性、遺伝子発現ウインドウの拡大、遺伝子発現のタイミングまたは発生進行の改変、DNA結合エレメントの変異および/またはDNA結合エレメントの付加。挿入すべきプロモーターエレメントとしては、限定ではないが、プロモーターコアエレメント、たとえば限定ではないが、CAATボックス、CCAATボックス、Prinowボックス、および/またはTATAボックス、誘導性発現のための翻訳調節配列および/またはリプレッサー系、たとえばTETオペレーターリプレッサー/オペレーター/インデューサーエレメント、またはスルホニルウレアリプレッサー/オペレーター/インデューサーエレメントがあり得る。脱水応答性エレメント（DRE）は、乾燥応答性遺伝子rd29Aのプロモーターのシス作用性プロモーターエレメントとして最初に同定され、9bpの保存コア配列TACCGACATを含む（Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994) *Plant Cell* 6, 251-264）。DREを内在性プロモーターに挿入すると、下流遺伝子の乾燥誘導性発現を付与することができる。別の例は、多くのABAおよび/またはストレス調節遺伝子に存在することがわかっている（C/T）ACGTGGCコンセンサス配列を含むABA応答性エレメント（ABRE）である（Busk P. K., Pages M. (1998) *Plant Mol. Biol.* 37: 425-435）。35SエンハンサーまたはMMVエンハンサーを内在性プロモーター領域に挿入すると、遺伝子発現が増加する（米国特許第5,196,525号明細書）。挿入すべきプロモーターまたはプロモーターエレメントは、編集されている細胞に対し内在性の、人工の、既存の、またはトランスジェニックなプロモーターまたはプロモーターエレメントの場合がある。

20

30

40

【0248】

一実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体を用いて、限定ではないがカリフラワーモザイクウイルス35Sエンハンサーなどのエンハンサーエレメントを内在性FMT1プロモーターの前に挿入してFTM1の発現を強化することができる

50

。さらなる実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体を用いてTE Tオペレーターリプレッサー/オペレーター/インデューサー系の構成要素またはスルホニルウレアリプレッサー/オペレーター/インデューサー系の構成要素を植物ゲノムに挿入して、導入遺伝子選択マーカーを組み入れることなく、誘導可能な発現系を作成または制御することができる。

【0249】

別の実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体を用いてプロモーターまたはプロモーターエレメントを欠失させることができ、ここでプロモーター欠失（またはプロモーターエレメント欠失）の結果として以下のいずれか1つ、または以下の任意の組み合わせの1つが得られる：恒久的に不活性化された遺伝子座位、プロモーター活性の上昇（プロモーター強度の上昇）、プロモーター組織特異性の上昇、プロモーター活性の低下、プロモーター組織特異性の低下、新しいプロモーター活性、誘導可能プロモーター活性、遺伝子発現ウインドウの拡大、遺伝子発現のタイミングまたは発生進行の改変、DNA結合エレメントの変異および/またはDNA結合エレメントの付加。欠失させるべきプロモーターエレメントは、限定ではないが、プロモーターコアエレメント、プロモーターエンハンサーエレメント、または35Sエンハンサーエレメントであり得る。欠失すべきプロモーターまたはプロモーターフラグメントは、編集されている細胞に対し内在性、人工、既存、またはトランスジェニックであり得る。

10

【0250】

さらに別の実施形態では、修飾すべき関心対象の少なくとも1つのゲノム標的部位はターミネーターの場合があり、該ターミネーターの編集には、「ターミネーター交換」または「ターミネーター置換」とも呼ばれる、ターミネーターを置換ターミネーターとも呼ばれる異なるターミネーターで置換すること、またはターミネーターフラグメントを置換ターミネーターフラグメントとも呼ばれる異なるターミネーターフラグメントで置換することが含まれ、該ターミネーター置換の結果として以下のいずれか1つ、または以下の任意の組み合わせの1つが得られる：ターミネーター活性の上昇、ターミネーター組織特異性の上昇、ターミネーター活性の低下、ターミネーター組織特異性の低下、DNA結合エレメントの変異および/またはDNA結合エレメントの欠失または付加。修飾すべきターミネーターまたはそのフラグメントは、編集されている細胞に対し内在性の、人工の、既存の、またはトランスジェニックなターミネーターであり得る。置換ターミネーターは、編集されている細胞に対し内在性の、人工の、既存の、またはトランスジェニックなターミネーターまたはそのフラグメントであり得る。

20

30

【0251】

一実施形態では、修飾すべき関心対象の少なくとも1つのゲノム標的部位は、ターミネーターの場合があり、編集すべき該ターミネーターは、トウモロコシArgos 8およびSRTF18遺伝子のターミネーター、ならびにほかのターミネーター、たとえばジャガイモPinIIターミネーター、ソルガムアクチンターミネーター（国際公開第2013/184537号A1）、イネT28ターミネーター（国際公開第2013/012729号A2）、AT-T9 TERM（国際公開第2013/012729号A2）、およびGZ-W64A TERM（米国特許第7,053,282号明細書）を含む群より選択される。

40

【0252】

一実施形態では、本発明の少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体は、同時送達されるRT配列と組み合わせることで用いることができ、それによってターミネーターまたはターミネーターエレメントを関心対象のゲノムヌクレオチド配列に挿入することが可能になり、このターミネーター（エレメント）挿入の結果として以下のいずれか1つ、または以下の任意の組み合わせの1つが得られる：ターミネーター活性の上昇、すなわちターミネーター強度の上昇、ターミネーター組織特異性の上昇、ターミネーター活性の低下、ターミネーター組織特異性の低下、DNA結合エレメントの変異および/またはDNA結合エレメントの付加。

50

【0253】

挿入すべきターミネーターまたはエレメントまたはそのフラグメントは、編集されている細胞に対し内在性の、人工の、既存の、またはトランスジェニックなターミネーター（またはターミネーターエレメント）であり得る。

【0254】

さらに別の実施形態では、少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体を用いてターミネーターまたはターミネーターエレメントを欠失させることができ、ここでターミネーター欠失（またはターミネーターエレメント欠失）の結果として以下のいずれか1つ、または以下の任意の組み合わせの1つが得られる：ターミネーター活性の上昇（ターミネーター強度の上昇）、ターミネーター組織特異性の上昇、ターミネーター活性の低下、ターミネーター組織特異性の低下、DNA結合エレメントの変異および/またはDNA結合エレメントの付加。欠失すべきターミネーターまたはターミネーターフラグメントは、編集されている細胞に対し内在性、人工、既存、またはトランスジェニックであり得る。

10

【0255】

一実施形態では、本発明の少なくとも1つの部位特異的エフェクター複合体を用いて、導入遺伝子選択マーカを組み入れることなく、細胞のゲノムの制御配列を改変または置換することができる。制御配列は、生物内で特定の遺伝子の発現を増加または低下させることができる、かつ/または生物内で遺伝子の組織特異的発現を改変することができる、核酸分子のセグメントである。制御配列の例としては、限定ではないが、3'UTR（非翻訳領域）領域、5'UTR領域、転写アクチベーター、転写エンハンサー、転写リプレッサー、翻訳リプレッサー、スプライシング因子、miRNA、siRNA、人工miRNA、プロモーターエレメント、CAMV 35Sエンハンサー、MMVエンハンサーエレメント、SECISElement、ポリアデニル化シグナル、およびポリユビキチン化部位が挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明の少なくとも1つの標的化修飾、または調節エレメントの置換の形態の編集の結果として、改変されたタンパク質翻訳、RNA切断、RNAスプライシング、転写終了または翻訳後修飾が得られる。一実施形態では、調節エレメントをプロモーター内で特定することができ、そしてこれらの調節エレメントを編集または修飾して、プロモーターのアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションのために最適化することができる。

20

【0256】

一実施形態では、修飾すべき関心対象の少なくとも1つのゲノム標的部位はポリユビキチン化部位であり、ポリユビキチン化部位の修飾の結果、タンパク質の分解速度が変わる。ユビキチンタグは、タンパク質をプロテアゾームまたは自食作用により分解させる。プロテアゾーム阻害剤がタンパク質過剰生産を招くことは公知である。関心対象のタンパク質をコードするDNA配列に対する修飾の結果、関心対象のタンパク質の少なくとも1つのアミノ酸を修飾することができ、この修飾によりタンパク質のポリユビキチン化（翻訳後修飾）が可能になり、タンパク質分解の改変が得られる。

30

【0257】

さらなる実施形態では、修飾すべき関心対象の少なくとも1つのゲノム標的部位は、トウモロコシEPPSPS遺伝子のポリユビキチン化部位であり、ポリユビキチン化部位が修飾されると、EPPSPSのタンパク質分解速度が遅くなるため、タンパク質含有率が高くなる。

40

【0258】

さらなる実施形態では、修飾すべき関心対象の少なくとも1つのゲノム標的部位はイントロン部位であり、該修飾はイントロン増強モチーフをイントロンに挿入することからなり、その結果として該イントロンを含む遺伝子の転写活性が調節される。

【0259】

次に、本発明を以下の実施例により説明するが、本発明の範囲を制限するものと解釈すべきではない。

【0260】

50

実施例

実施例 1：次世代シーケンシングによる塩基編集の検証

前述の標的に対する、ニッカーゼと結合した塩基エディターの活性を試験するため、A P O B E C - X T E N - C a s 9 (ニッカーゼ) - U G I (配列番号 1 および配列番号 2) をコードするプラスミドを標準的な方法で構築し、塩基エディターおよび s g R N A をゼア・メイズ (Z e a m a y s) 組織由来の細胞内で一過的に発現させた。この複合体と併せて、実施例 2 ~ 6 で設計した g R N A も試験した。さらに、関心対象の標的部位に関する特異的 P A M モチーフ (配列番号 3 ~ 13 および 23 を参照) を定めた。

【0261】

また、特定の除草剤の標的遺伝子の関連アミノ酸の変換に利用できる標的部位の範囲を広げるために、S a K K H - B E 3 および V Q R - B E 3 タンパク質 (K o m o r A . e t a l . , I n c r e a s i n g t h e g e n o m e - t a r g e t i n g s c o p e a n d p r e c i s i o n o f b a s e e d i t i n g w i t h e n g i n e e r e d C a s 9 - c y t i d i n e d e a m i n a s e f u s i o n , N a t . B i o t e c h . (2 0 1 7)) をトウモロコシでの発現用にコドン最適化し、合成し、適切な s g R N A と一緒にプラスミド内にクローン化して、同じトウモロコシ細胞系で発現させた。

【0262】

塩基エディター発現プラスミドでの処理から 12 ~ 96 時間後、細胞集団から全ゲノム D N A を抽出し、標的化ディープシーケンシングに供して、標的における塩基変換の頻度およびパターンを分析した。除草剤抵抗性アミノ酸置換をもたらす変換を A L S 1 (特に P 197、S 653)、A L S 2 (特に P 197、S 653)、および P P O (特に C 215、A 220、G 221、N 425、Y 426) 遺伝子において作成する能力を評価した。

【0263】

実施例 2：塩基編集構成要素の形質転換およびスルホニルウレアまたはイミダゾリノンに対する選択

この文書に記載の方法により除草剤抵抗性を付与する塩基編集の実現可能性を示すため、実施例 1 に記載の塩基エディター、および実施例 1 で N G S により検証したトウモロコシ A L S 1、A L S 2 遺伝子を標的とするいくつかの特別設計の g R N A を、ゼア・メイズ (Z e a m a y s) の組織に形質転換させ、(P 197 または S 653 置換は) スルホニルウレア、または (S 653 置換は) イミダゾリノンを含む選択培地上で再生させた。除草剤抵抗性植物は、塩基エディターの作用により塩基変換されているはずであり、その結果、どの塩基エディターが送達されたかによって、197 番目のプロリンまたは 653 番目のセリンが置換されたはずである。塩基変換事象を検証するため、除草剤抵抗性植物の A L S 遺伝子を相補性除草剤を用いて選択し、分子的技法により分析した。

【0264】

実施例 3：塩基エディターの作用により除草剤抵抗性を同時選択して非結合座位の非選択修飾の頻度を高める

遺伝子編集事象により植物を単離する、導入遺伝子を用いない選択が、ゲノム工学において好適かつ端的なツールとなることを示すために、実施例 2 に記載の方法論を部位特異的ヌクレアーゼの同時送達と組み合わせ、同一細胞内で除草剤遺伝子の塩基変換と関心対象の遺伝子の標的化修飾とを同時に平行して発生させた。同じプラスミドまたは第 2 のプラスミドに、s g R N A および任意選択により修復鋳型と一緒にヌクレアーゼをコードさせて、塩基エディターの作用により塩基変換が生じている同じ細胞内に標的化修飾を作成する。後の段階で、実施例 2 に記載したように、植物を除草剤選択下で再生させることができ、そして分子のおよびほかの適切な技法により関心対象の遺伝子の標的化修飾について選抜することができるが、除草剤選択により、少なくとも 1 つの第 2 の修飾、すなわち修飾すべき関心対象の遺伝子である第 2 のゲノム座位の少なくとも 1 つの標的化修飾について選抜すべき細胞の数を大幅に低下させることができる。

10

20

30

40

50

【0265】

実施例4：機能性CRISPR/Cpf1塩基エディターの設計および塩基編集ウィンドウの定義

この例では、第2のCRISPRタンパク質、Cpf1を用いて塩基エディター複合体をゲノム標的に送達した。CRISPR/Cas9と同様に、CRISPR/Cpf1もそのDNA標的に結合するときRループ様構造を形成し、一本鎖として塩基変換に使える非標的鎖を生成する。しかし、Cpf1由来塩基エディターによる塩基変換ウィンドウの正確な位置がわからないので、標的のPAM配列に対する塩基変換パターンを分析する必要がある。塩基変換ウィンドウは、実施例1に記載のトウモロコシゲノムのGCリッチ配列を標的とするCpf1ベースのエディターの送達後、細胞集団におけるそれらの配列に対する標的化NGSにより定義することができる。ほかの標的植物については、このストラテジーを植物に応じて改造することができる。

10

【0266】

実施例5：PPO遺伝子の1ヌクレオチド欠失を用いて、修復鋳型または相同組換えなしに、選択修飾を生産する

アマランサス・ツベルクラタス (*Amaranthus tuberculatus*) のPPO遺伝子の210番目のグリシンの1アミノ酸欠失が、この雑草にPPO阻害除草剤に対する抵抗性を与えている (Patzoldt, W. L. et al. (2006). "A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase" PNAS 103(33): 12329-12334)。このアイソフォームはPX2Lとも呼ばれる。これに相当するニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) のアミノ酸はPPO2遺伝子の178番目のグリシンである。ゼア・メイズ (*Zea mays*) では、相当するアミノ酸はアラニンであるが、周辺残基が高度に保存されているので、なおも機能性活性部位を構成し得、それがアラニン欠失により抵抗性となる。

20

【0267】

この実施例では、Cas9またはCpf1などの部位指定ヌクレアーゼを適切なcrRNAまたはsgRNAと併用して、このアミノ酸のコドンの近くに二本鎖切断を作成することができる。活性PPO酵素を保存するが除草剤の結合を阻害する3塩基欠失の結果、除草剤抵抗性植物が得られる。このように、この選択修飾は、修復鋳型または相同組換えを用いることなく作成することができるので、トランスジェニックマーカールを用いないストラテジーを提供する。

30

【0268】

実施例6：さらなる用途

上記実施例1~3でCRISPR/Cas9について説明した用途とともに、CRISPRヌクレアーゼのCasX、CasY、およびCpf1を用いたさらなる例が考えられる。また、実施例1に記載のCas9と結合させた塩基エディターまたは実施例4に記載のCpf1と結合させた塩基エディターを用いて早期終止コドンを選択遺伝子標的または植物の選抜用表現型マーカーに導入する。具体例として、表現型遺伝子(たとえば、多くの光沢遺伝子、ゴールドデンほか)の終止コドンを挙げるができる。

40

【0269】

除草剤抵抗性に基づく選択のさらなる標的としては、前述したPPO、ALS、およびEPSPS遺伝子におけるほかのアミノ酸欠失、早期終止コドンの導入、またはアミノ酸変換も挙げられる。PPO遺伝子の塩基編集に好適なgRNAプロトスペーサー配列を提供する(配列番号7~13参照)。

【0270】

さらに、aCasXと結合させた塩基編集複合体の配列(配列番号14)、AsCpf1と結合させた塩基編集複合体の配列(配列番号15)、およびシチジンデアミナーゼPmCDA1を、Cas9と結合させた塩基編集複合体に組み入れる配列(配列番号16)

50

も提供する。

【0271】

最適化については、そして特にCRISPRヌクレアーゼと結合させた塩基編集複合体の新規の設計については、以下の構成要素の任意の順および組み合わせを用いることができる：nCas9 (D10A; 配列番号17)、CasX (配列番号18)、nAscPfl (R1226A; 配列番号19)、APOBEC1 (配列番号20)、UGI (配列番号21)、PmCDA1 (配列番号22)、ならびにリンカー、たとえばXTENリンカー、および関心対象のゲノム部位に応じて核局在化シグナルまたはほかの小器官標的化シグナル、あるいは前述の構成要素の任意の組み合わせ。

【0272】

実施例7：イネ変異植物の選抜

Yuan Zong et al. (Zong, Y. et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. Nat. Biotechnol. 2017, doi: 10.1038/nbt.3811)にしたがい、OsALS遺伝子 (Genbank番号: AY885674.1) の2つの異なる部位 (S1およびS2) を同時に標的化するベクター pH-nCas9-PBE-OsALS-S1/S2を、pH-nCas9-PBEに基づいて構築した。OsALSのS1部位を除草剤選択部位として用いた。S1座位が変異すると、植物はニコスルフロンなどの除草剤に対する抵抗性を得る (Tranel and Wright, 2002)。本実験のsgRNA標的配列を表1に示す。

【0273】

表1．イネsgRNA標的配列

【表1】

sgRNA	標的配列
sgRNA-OsALS-S1	CAGGTCCCCCGCCGCATGATCGG
sgRNA-OsALS-S2	CCTACCCGGGCGGCGTCCATG

下線部はPAM。

【0274】

pH-nCas9-PBE-OsALS-S1/S2バイナリーベクターを電気穿孔によりアグロバクテリウム (Agrobacterium) 株AGL1内へ形質転換させた。Shan et al. (Shan, Q. et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat. Biotechnol. 31, 686-688 (2013))にしたがい、イネ品種Zhonghua 11のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換、組織培養、および再生を実施した。組織培養のあいだ、ハイグロマイシン選択 (50 μg/ml) を用いた。(本実験は概念を証明するものなので、まずはハイグロマイシンを用いて、次にニコスルフロンを用いて植物を選択した。目的は、まずはトランスジェニック植物を得ること、そして除草剤抵抗性について選抜することであった。) イネ植物の再生後、10再生苗を、野生型植物ならば生存できない0.0065PPMのニコスルフロンを含有する選択培地で栽培した。14日後、4苗が生存していた。この4苗からDNAを抽出した。ALS遺伝子をPCRで増幅し、変異体の遺伝子型の配列を決定した。結果によると、4苗のすべてがS2座位に塩基変異を有しており、これらの除草剤抵抗性植物のS2部位の変異率は100% (4/4) であった。変異パターンを図2Aに示す。

【0275】

実施例8：コムギ変異植物の選抜

Yuan Zong et al. (Zong, Y. et al. Precise

10

20

30

40

50

e base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. Nat. Biotechnol. 2017, doi: 10.1038/nbt.3811) にしたがひ、pTaU6 に基づき以下のコンストラクトを調製した。

1) BゲノムのTaALS遺伝子(GenBank番号: AY210406)のS2部位を標的とするpTaU6-TaALS-S2、

2) BゲノムおよびDゲノムのTaACCCase遺伝子(Genbank番号: EU660901およびEU660902)の1つの部位を標的とするpTaU6-TaACCCase、

3) TaALS遺伝子の2つの部位を平行して標的化するpTaU6-TaALS-S1/S2、および

4) TaALS遺伝子とTaACCCase遺伝子とを平行して標的化するpTaU6-TaALS-S1/TaACCCase。

【0276】

TaALS S1部位を除草剤選択部位として用いた。この部位が変異すれば、植物は除草剤(ニコスルフロンなど)抵抗性を得るが、TaALS S2部位の変異だけでは抵抗性を付与しない(Tranel and Wright, 2002)。本実験で用いたsgRNA標的配列を表2に示す。

【0277】

表2. コムギsgRNA標的配列

【表2】

sgRNA	標的配列
sgRNA-TaALS-S1	CAGGTC CCCCCGCCGCATGAT CGG
sgRNA-TaALS-S2	CCTACCCTGGCGGCGCGT CCATG
sgRNA-TaACCCase	TTCAGCTACTAAGACAGCGC AGG

下線部はPAM。

【0278】

形質転換についての以前の記述(Zhang, K., Liu, J., Zhang, Y., Yang, Z. & Gao, C. Biolistic genetic transformation of a wide range of Chinese elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. J. Genet. Genomics. 42, 39-42 (2015)) にしたがひ、プラスミドDNA(pnCas9-PBEおよびpTaU6ベクターシリーズの等量の混合)をKonun 199の幼胚への撃込みに用いた。撃込み後、該文献にしたがひ胚を処理し、また組織培養の際に選択因子は用いなかった。

【0279】

BゲノムのTaALS遺伝子のS2部位の標的化のみで得たコムギ植物を3~4植物ごとに1試料としてプールして、PCR/REで変異を検出した。258試料(個々の植物の数としては、およそ1000)をPCR/REで検出したが、変異は検出されなかった。

【0280】

TaACCCase遺伝子の部位の標的化のみで得たコムギ植物を3~4植物ごとに1試料としてプールして、サンガーシーケンシングに供した。64試料(個々の植物の数としては、約256)の配列決定を行ったが、変異は検出されなかった。

【0281】

TaALS遺伝子S1およびS2部位を平行して標的化して得たコムギ植物(植物数はおよそ800)を、まずは(野生型植物ならば生存できない)0.13PPMのニコスルフロンを含有する選択培地で栽培した。30日後、12苗が生存しており、そのうち9苗

10

20

30

40

50

が T a A L S - S 2 部位に塩基変異を有していた。ニコスルフロン選択培地を用いた A L S - S 2 部位変異植物の選択効率は、75% (9/12) であった。5つの変異体の変異タイプを図2Bに示す。

【0282】

T a A L S および T a A C C a s e 遺伝子を平行して標的化して得たコムギ植物 (植物数は約800) を 0.13 P P M のニコスルフロンを含有する選択培地で栽培した。30日後、9苗が生存しており、2つの植物が T a A C C a s e 部位に塩基変異を有していた。ニコスルフロン選択培地を用いた T a A C C a s e 部位変異植物の選択効率は、22% (2/9) であった。T a A C C a s e 部位の変異パターンを図2Cに示す。

【0283】

実験結果によると、変異率が非常に低い標的遺伝子 (たとえば標的遺伝子の変異率が0.5%) について、本発明の方法は、標的変異を得る確率を10~100倍高めることができる。

【0284】

実施例9: T a A L S - P 1 7 3 に基づいたコムギの塩基同時編集系の開発

この試験では、コムギ形質転換の際に T a A L S - P 1 7 3 に対応する s g R N A 部位を用いて除草剤選択系を確立した。P n C a s 9 - P B E および T a A L S - P 1 7 3 - s g R N A のコンストラクトを微粒子銃を用いて640個のパンコムギ品種 K e n o n g 1 9 9 の未成熟胚細胞に送達した。苗 (高さ2~3cm) の再生後、P C R 制限酵素消化アッセイ (P C R - R E アッセイ) を用いて変異頻度を分析した。同時に、同じ苗を 0.27 p p m のニコスルフロンを含有する培地に移した (図3)。除草剤含有培地で3週間栽培した後、P C R - R E アッセイで特定した14変異苗 (2.1%) のうち10苗 (1.56%) が抵抗性を示したが、3つのセンシティブ変異体には一切アミノ酸置換が含まれなかった (表3)。

【0285】

表3

【表3】

抵抗性		A ゲノム	B ゲノム	D ゲノム
		置換	置換	置換
R	T0-1	F/S	F/S	F/S
R	T0-2	F(ヘテロ)	F(ホモ)	S(ホモ)
R	T0-3	S(ヘテロ)	F/S	S(ヘテロ)
S	T0-4	WT	WT	SM
R	T0-5	S(ホモ)	S(ヘテロ)	F/S
R	T0-6	S(ホモ)	F,C(ヘテロ)	WT
S	T0-7	S(ホモ)	F,C(ヘテロ)	WT
R	T0-8	WT	WT	F(ヘテロ)
R	T0-9	F(ホモ)	F/S	S(ヘテロ)
R	T0-10	F(ホモ)	F/S	S(ヘテロ)
R	T0-11	S(ヘテロ)	F(ヘテロ)	F/S
R	T0-12	S(ヘテロ)	F(ヘテロ)	F/S
S	T0-13	WT	SM	WT
S	T0-14	WT	SM	WT

S M : サイレント変異、S : センシティブ、R : 抵抗性、ホモ : ホモ接合性、ヘテロ : ヘテロ接合性。

【0286】

これらの結果により、TaALS-P173置換が除草剤含有培地から識別できることが確認された。発明者らは次に、この部位がほかのゲノム編集事象の選択にも使用可能かどうか試験した。そこで3つのほかの部位(TaALS-A98、TaALS-A181、ならびにTaACCCase-A2004)をそれぞれTaALS-P173と組み合わせた。選択効率を評価するために、TaALS-P173部位標的化系を同時撃込みした再生苗をニコスルフロン含有培地に置き、生存苗を遺伝子型決定に供した。標的変異体は、3部位の全て(表4)で最大78%の選択効率で検出された。部位TaALS-A181およびTaACCCase-A2004では、選択効率は比較的低かった(約25%)が、それはGCコンテキストではデアミナーゼAPOBEC1の変換能力が低かったためと考えられる。

10

【0287】

GCコンテキストを有する部位での選択効率を高めるために、APOBEC1とは異なる配列嗜好性をもつ別のデアミナーゼ、PmCDA1で、APOBEC1を置換した。新たに作製した塩基エディターpPmCDA1-PBE、TaACCCase-A2004-sgRNA、およびTaALS-P173-sgRNAのコンストラクトを640個の未成熟胚細胞に微粒子銃を用いて送達した。2生存苗が両方とも(100%)、標的部位TaACCCase-A2004に変異アレルを含んでいた(表4)。

【0288】

表4

20

【表4】

	デアミナーゼ	生存植物数	第2の部位の 変異体数	選択効率 (%)
TaALS-P173+A98	APOBEC1	18	14	78
TaALS-P173+A181	APOBEC1	8	2	25
TaALS-P173 +TaACCCase A2004	APOBEC1	9	2	22
	PmCDA1	2	2	100

30

【0289】

実施例10: ZmALS-P165に基づいたトウモロコシの塩基同時編集系の開発
トウモロコシの同時編集系を確立するために、アセト乳酸シンターゼ部位に対応するTaALS-P173を標的化して除草剤抵抗性を試験した。ZmALS2の1アレル編集により植物に除草剤抵抗性を付与できることが報告されている(Svitashveta et al, 2016)。そこでZmALS-P165を標的とするバイナリーベクターを未成熟胚に形質転換させた(ZmALS1でもZmALS2でも、ZmALS-P165部位は保存された)。再生植物から3つの独立した変異体を得られ、それらの遺伝子型は同じであった。CからTへの置換を含む2つのZmALS1アレルおよび1つのZmALS2アレルが、165番目のプロリンからロイシンへの1アミノ酸残基の変更をもたらした。ZmALS2にヘテロ接合P165L置換を有する1つの変異植物が、メソスルフロン-メチルというスルホニルウレア分類の除草剤に対し抵抗性を示した(図4)。

40

【0290】

ZmALS-P165部位が選択マーカーの役割を良好に果たし得ることを確認した後、ほかの2つの部位、ZmACCCase A2004およびZmSbe2 Stopをそれぞれこの選択部位と組み合わせた。形質転換には微粒子銃とアグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介送達の両方を用いた。ZmACCCase A2004部位はGCコンテキスト内だったので、APOBEC1に替えてPmCDA1を用いた。

【0291】

微粒子銃送達による選択効率を評価するため、撃ち込んだカルスならびにアグロバクテ

50

リウム (*Agrobacterium*) で形質転換した未成熟胚をメソスルフロン - メチル含有培地に置いた。生存苗は標的変異を示した。

【0292】

実施例 11 : OsALS - P171 に基づいたイネの塩基同時編集系の開発

イネの塩基同時編集系を構築するために、アセト乳酸シンターゼ部位に対応する TaALS - P173 を標的化して除草剤抵抗性を試験した。1 アレル編集により植物に除草剤抵抗性を付与できることが報告されている (Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Shimizu, M., Kobayashi, H., & Shimizu, T. (2008). Herbicide sensitivities of mutated enzymes expressed from artificially generated genes of acetolactate synthase. *Journal of pesticide science*, 33(2), 128-137)。そこで OsALS - P171 を標的とするバイナリーベクターを未成熟胚に形質転換させた。再生植物から変異体を得た。

10

【0293】

OsALS - P171 部位が選択マーカーの役割を良好に果たし得ることを確認した後、ほかの3つの部位、OsAccase W2125、OsBDAH2 Stop および OsSbe2 Stop をそれぞれこの選択部位と組み合わせた。形質転換には微粒子銃とアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介送達の両方を用いた。生存苗は標的変異を示した。

20

【0294】

実施例 12 : ZmALS - P197 または ZmALS - G654 に基づいたトウモロコシの塩基同時編集系の開発

1. 塩基エディターにより作成された除草剤抵抗性を付与するアミノ酸変換の発生

イミダゾリノンおよびスルホニルウレアのような除草剤群に抵抗性のある雑草に見られるアミノ酸に変換するため、ゼア・メイズ (*Zea mays*) の標的アミノ酸を選定した。図5の緑色の矢印は、所望の変換を得るためのコード鎖または非コード鎖へのガイド配列である。注記：本実施例でナンバリングしたアミノ酸残基の座標は、アラビドプシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*) の典型的な ALS 遺伝子を基準としている。トウモロコシおよびコムギのペプチド配列では、これらの残基の位置は多少異なる。

30

【0295】

2. トウモロコシ ALS の除草剤センシティブ P197 コドンを、塩基エディターにより効率よく編集することができる

全実験をトウモロコシのプロトプラスト系で実施した。sgRNA の Pol I II プロモーター : P197 座位の ALS1 遺伝子 (図6の左上のグラフ) および G654 座位の ALS2 遺伝子 (図6の右上のグラフ) を修飾するためにガイドを作製した。塩基エディター系は、シングルベクター系であり、この場合は pUbi1 駆動塩基エディターおよび ZmU3 駆動ガイド RNA を含む。上に示す結果は、ALS1 および ALS2 両方について、ガイド RNA の C ごとに計算し、そして陰性対照のバックグラウンドを引いた、C から T への変換頻度 (%) である。ここで示す頻度は、同一細胞内で P197 コドンの C が片方だけまたは両方とも変更されたかどうかは特定しない。G654 座位でも変更は明白であったが、程度は前者ほどではなかった。

40

【0296】

3. 除草剤センシティブ残基は、処理細胞の最大 6% の頻度で除草剤抵抗性に変換される (図7)。

【0297】

図6に示すデータの別の分析法は、所望のアミノ酸コドンの変換を示すリード数の計測である。最終%データをプロトプラストの形質転換効率に関し正規化した。

【0298】

50

上のパネル：ALS1およびALS2座位の両方でプロリン197がロイシンまたはセリンに変換されているリード%を示す。これはPol IIIプロモーターを用いた実験のデータである。

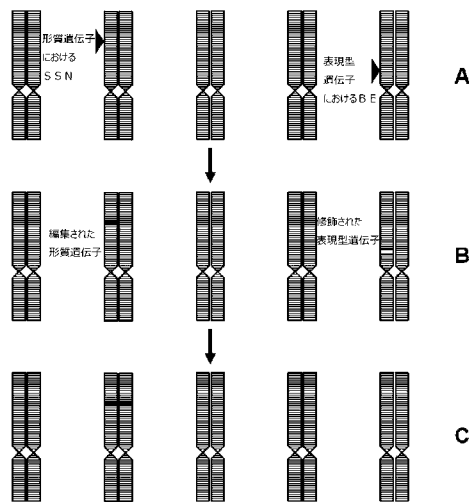
【0299】

真ん中のパネル：ALS1およびALS2座位の両方でプロリン197がロイシンまたはセリンに変換されているリード%を示す。これはPol IIIプロモーターおよびsgRNAのリボザイム送達戦略を用いた実験のデータである。

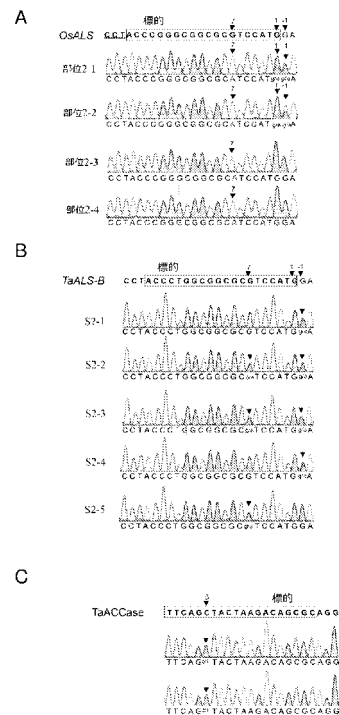
【0300】

下のパネル：ALS1およびALS2座位の両方でグリシン654がアスパラギン酸に変換されているリード%を示す。これはPol IIIプロモーターおよびsgRNAのリボザイム送達戦略を用いた実験のデータである。

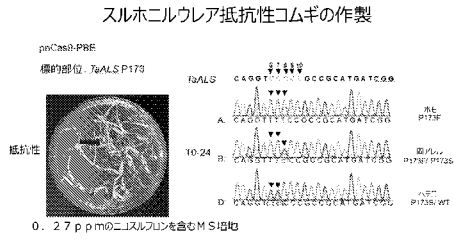
【図1】



【図2】

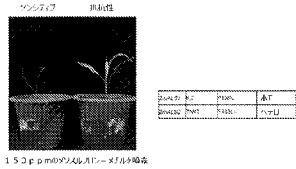


【 図 3 】

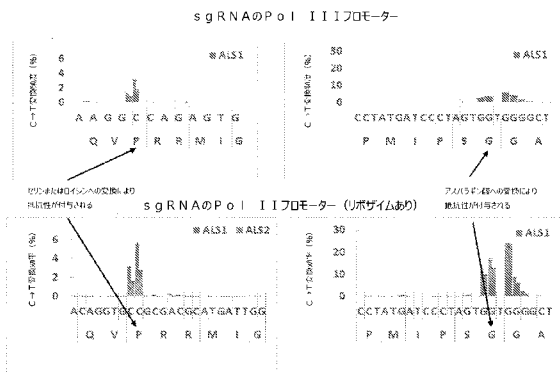


【 図 4 】

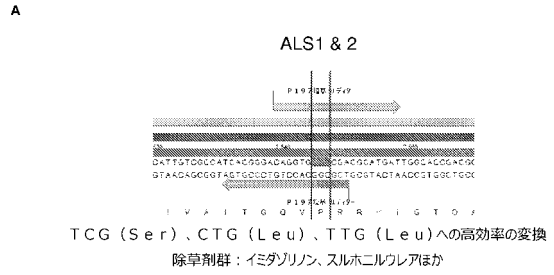
スルホニルウレア抵抗性トウモロコシの作製



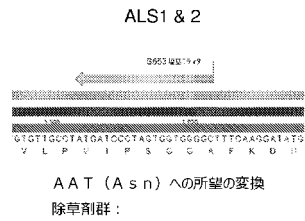
【 図 6 】



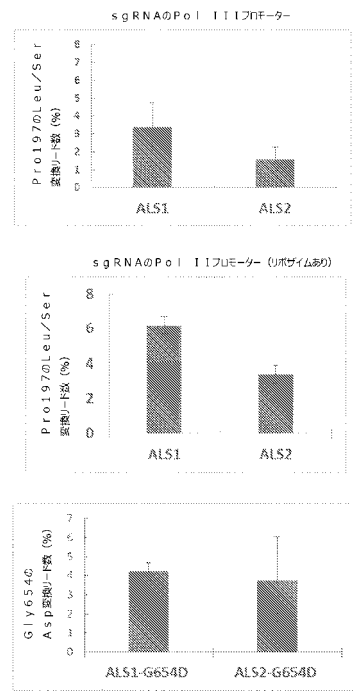
【 図 5 】



B



【 図 7 】



【配列表】

2020518253000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和2年1月20日(2020.1.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの改変植物細胞、または前記少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカ配列を安定的に組み込むことなく単離する方法であって、

a. 改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾を導入することであって、前記少なくとも1つの標的化塩基修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；

b. 前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾は、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を前記第2の植物ゲノム標的部位に作成する少なくとも1つの部位特異的エフェクターを用いて導入され、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾は、前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも1つの植物細胞に、または前記少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および

c.

i. 前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾により前記第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた前記少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに

ii. 前記第2の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、

少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離することを含む、方法。

【請求項2】

ステップbが、前記少なくとも第2の植物ゲノム標的部位に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型を導入することをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記少なくとも1つの第1の標的化修飾および前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得るステップであって、任意選択により、前記関心対象の遺伝子型は、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、さらなるステップdを含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、少なくとも1つの塩基編集複合体に一時的または恒久的に結合しており、前記塩基編集複合体は、ステップaの前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾を媒介するか；

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CasもしくはCpf1ヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノー

トヌクレアーゼ、FokIもしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼを含むヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または2部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、または塩基エディター、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも1つから選択されるか；あるいは

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CRISPRベースのヌクレアーゼであり、前記CRISPRベースのヌクレアーゼは、前記少なくとも1つの塩基編集複合体を導く部位特異的DNA結合ドメインを含み、前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、

a. SpCas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、VQR-Cas9、St1Cas9を含む、Cas9、

b. Ascpf1、LbCpf1、FnCpf1を含む、Cpf1、

c. CasX、および

d. CasY、

ならびに前述したCRISPRベースのヌクレアーゼの任意のバリエーションおよび誘導体を含む群より選択され、好ましくは前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたCRISPRベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的DNAニッカーゼに、または全DNA切断能力を失ったDNA結合エフェクターに変換されている、請求項1記載の方法。

【請求項5】

前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾が、少なくとも1つの塩基エディターを構成要素として含む、少なくとも1つの塩基編集複合体により作成される、請求項1記載の方法。

【請求項6】

前記塩基編集複合体が、少なくとも1つのシチジンデアミナーゼ、またはその触媒活性フラグメントを含む、請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾が、ヌクレオチドC、A、T、またはGのいずれかの、任意のほかのヌクレオチドへの変換である、請求項1記載の方法。

【請求項8】

前記塩基編集複合体がAPOBEC1構成要素を含むか；

前記塩基編集複合体がUGI構成要素を含み、かつ/または前記塩基編集複合体がXTEEN構成要素を含むか；あるいは

前記塩基編集複合体がPmCDA1構成要素を含む、請求項5記載の方法。

【請求項9】

前記少なくとも1つの塩基編集複合体が2つ以上の構成要素を含み、前記少なくとも2つの構成要素は物理的に結合しているか；

前記少なくとも1つの塩基編集複合体が2つ以上の構成要素を含み、前記少なくとも2つの構成要素は単体の構成要素として与えられるか；あるいは

前記少なくとも1つの塩基編集複合体の少なくとも1つの構成要素が、前記少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けるために少なくとも1つの小器官局在化シグナルを含む、請求項5記載の方法。

【請求項10】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位が、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、前記少なくとも1つの表現型選択形質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する、請求項1記載の方法。

【請求項11】

関心対象の前記少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの内在性遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、あるいは前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、前記少なくとも1つの内在性遺伝子または前記少なくとも1つの導入遺伝子は、前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質に前記少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは前記少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速度、胚発生のブースターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項12】

前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位が、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むE P S P S阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むA L SまたはA H A S阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリーロキシフェノキシプロピオネート(F O P)を含むA C C a s e阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド合成阻害剤、4-ヒドロキシフェニル-ピルビン酸-ジオキシゲナーゼ(H P P D)阻害剤、またはほかのカロテノイド合成標的の阻害剤を含むカロテノイド合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系I電子ダイパーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系II阻害剤に対する抵抗性/耐性、P P O阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンパ(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシシンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項13】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、植物毒抵抗性/耐性形質、好ましくは除草剤抵抗性/耐性形質であり、前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、植物毒化合物、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性を付与し、前記化合物は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体、またはその子孫に加えられる外来性化合物である、請求項1記載の方法。

【請求項14】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位がA L Sであるか；
前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位がP P Oであるか；
前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位がE P S P S、A L S、またはP P Oであり、ここでE P S P S、A L S、またはP P Oは、少なくとも1つの対応するアミノ酸変換をもたらす少なくとも1つの核酸変換を含み、前記少なくとも1つの核酸変換は、少なくとも1つの塩基エディターにより作成される、請求項1記載の方法。

【請求項15】

標的化修飾が、配列番号25のA L S基準配列と比べてA 1 2 2をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号25のA L S基準配列と比べてP 1 9 7をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号25のA L S基準配列と比べてA 2 0 5をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号25のA L S基準配列と比べてD 3 7 6をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号25のA L S基準配列と比べてR 3 7 7をコードする配列に生

じるか；

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて W 5 7 4 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて S 6 5 3 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 25 の A L S 基準配列と比べて G 6 5 4 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて C 2 1 5 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて A 2 2 0 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて G 2 2 1 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて N 4 2 5 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 26 の P P O 基準配列と比べて Y 4 2 6 をコードする配列または I 4 7 5 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 27 の E P S P S 基準配列と比べて G 1 0 1 および G 1 4 4 をコードする配列に生じるか；

標的化修飾が、配列番号 27 の E P S P S 基準配列と比べて G 1 0 1 および A 1 9 2 をコードする配列に生じるか； あるいは

標的化修飾が、配列番号 27 の E P S P S 基準配列と比べて T 1 0 2 および P 1 0 6 をコードする配列に生じる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つの表現型選択形質が、少なくとも 1 つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体の特定または単離に便利な可視表現型であるか；

前記少なくとも 1 つの表現型選択形質が光沢表現型であるか；

前記少なくとも 1 つの表現型選択形質がゴールドン表現型であるか； あるいは

前記少なくとも 1 つの表現型選択形質が着色表現型または成長優位性表現型である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

少なくとも 1 つの改変植物細胞、または前記少なくとも 1 つの改変植物細胞を含む少なくとも 1 つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカー配列を安定的に組み込むことなく単離する方法であって、

a . 改変すべき少なくとも 1 つの植物細胞の第 1 の植物ゲノム標的部に、ヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または DNA 修飾試薬を含む少なくとも 1 つの第 1 の部位特異的エフェクターを用いて、少なくとも 1 つの第 1 の標的化コドン欠失修飾を導入することであって、前記少なくとも 1 つの標的化コドン欠失修飾により、少なくとも 1 つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；

b . 前記改変すべき少なくとも 1 つの植物細胞の第 2 の植物ゲノム標的部に、少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾を導入することであって、前記少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾は、前記少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾を前記第 2 の植物ゲノム標的部に作成する少なくとも 1 つの第 2 の部位特異的エフェクターを用いて導入され、前記少なくとも 1 つの第 2 の標的化修飾は、前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ改変すべき少なくとも 1 つの植物細胞に、または前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化修飾を含む少なくとも 1 つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物に導入されて、少なくとも 1 つの改変植物細胞を得る、導入すること；および

c .

i . 前記少なくとも 1 つの第 1 の標的化コドン欠失修飾により前記第 1 の植物ゲノム標的部位にもたらされた前記少なくとも 1 つの表現型選択形質を選択することにより、そ

して任意選択によりさらに

i i . 前記第2の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、

少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、

d . 任意選択により、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾および前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得ることであって、任意選択により、前記関心対象の遺伝子型は、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、交配させること、を含む、方法。

【請求項18】

ステップbが、前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位および/または前記少なくとも第2の植物ゲノム標的部位に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型を導入することをさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CasもしくはCpf1ヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノートヌクレアーゼ、FokIもしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または2部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも1つから選択されるか；

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CRISPRベースのヌクレアーゼであり、前記CRISPRベースのヌクレアーゼは、部位特異的DNA結合ドメインを含み、前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、

a . SpCas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、VQR-Cas9、St1Cas9を含む、Cas9、

b . AscPfl、LbCpf1、FnCpf1を含む、Cpf1、

c . CasX、および

d . CasY、

ならびに前述したCRISPRベースのヌクレアーゼの任意のバリエーションおよび誘導体を含む群より選択され、任意選択により前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたCRISPRベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的DNAニッカーゼに、または全DNA切断能力を失ったDNA結合エフェクターに変換されているか；あるいは

前記少なくとも部位特異的エフェクター、または前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターを含む複合体の少なくとも1つの構成要素が、前記少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けるために少なくとも1つの小器官局在化シグナルを含む、請求項17記載の方法。

【請求項20】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位が、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、前記少なくとも1つの表現型選択形質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する、請求項17記載の方法。

【請求項21】

関心対象の前記少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの内在性遺伝子で

あるかまたはそれによりコードされ、あるいは前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、前記少なくとも1つの内在性遺伝子または前記少なくとも1つの導入遺伝子は、前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質に前記少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは前記少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速度、胚発生のブースターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される、請求項17記載の方法。

【請求項22】

前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位が、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むEPSP阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むALSまたはAHAS阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリアルオキシフェノキシプロピオネート(FOP)を含むACCase阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド生合成阻害剤、4-ヒドロキシフェニル-ピルビン酸-ジオキシゲナーゼ(HPPD)阻害剤、またはほかのカロテノイド生合成標的の阻害剤を含むカロテノイド生合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系I電子ダイパーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系II阻害剤に対する抵抗性/耐性、PPO阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンバ(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシシンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される、請求項17記載の方法。

【請求項23】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位が、選択の目的で、アマランサス・ツベルクラタス(*Amaranthus tuberculatus*)のPPX2L遺伝子産物のホモログである、請求項17記載の方法。

【請求項24】

前記少なくとも1つの第1の標的化コドン欠失修飾が、配列番号28のアマランサス・ツベルクラタス(*Amaranthus tuberculatus*)のPPX2L遺伝子産物のG210残基に相当する位置に生じる、請求項17記載の方法。

【請求項25】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体の特定または単離に便利な可視表現型である、請求項17記載の方法。

【請求項26】

前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞が、ホルデウム・ウルガレ(*Hordeum vulgare*)、ホルデウム・バルバゾム(*Hordeum bulbosum*)、ソルガム・ビコロ(*Sorghum bicolor*)、サッカラム・オフィシナリウム(*Saccharum officinarium*)、ゼア・メイズ(*Zea mays*)などのゼア(*Zea*)属種、セタリア・イタリカ(*Setaria italica*)、オリザ・ミヌタ(*Oryza minuta*)、オリザ・サチワ(*Oryza sativa*)、オリザ・アウストラリエンシス(*Oryza australiensis*)、オリザ・アルタ(*Oryza alta*)、トリチカム・アエスチウム(*Triticum aestivum*)、トリチカム・デュラム(*Triticum durum*)、セカレ・ケレアレ(*Secale cereale*)、トリチカレ(*Triticale*)、マルス・ドメスチカ(*Malus domestica*)、ブラキポジウム・ジスタキオン(*Brachypodium distachyon*)、ホルデウム・マリナム(*Hordeum marinum*)、アエギロプス・タウスキイ(*Aegilops t*

auschii)、ダウカス・グロキジアタス(Daucus glochidiatus)、ベタ・ウルガリス(Beta vulgaris)などのベタ(Beta)属種、ダウカス・プシルス(Daucus pusillus)、ダウカス・ムリカタス(Daucus muricatus)、ダウカス・カロタ(Daucus carota)、ユーカリプタス・グランジス(Eucalyptus grandis)、ニコチアナ・シルベストリス(Nicotiana sylvestris)、ニコチアナ・トメントシホルミス(Nicotiana tomentosiformis)、ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)、ニコチアナ・ベンタミアナ(Nicotiana benthamiana)、ソラナム・リコペルシカム(Solanum lycopersicum)、ソラナム・ツベロサム(Solanum tuberosum)、コフェア・カネフォラ(Coffea canephora)、ウイティス・ウイニフェラ(Vitis vinifera)、エリトランテ・グッタータ(Erythraente guttata)、ゲンリセア・アウレア(Genlisea aurea)、ククミス・サチウス(Cucumis sativus)、マルス・ノタピリス(Marus notabilis)、アラビドプシス・アレノサ(Arabidopsis arenosa)、アラビドプシス・リラタ(Arabidopsis lyrata)、アラビドプシス・タリアナ(Arabidopsis thaliana)、クルキヒマラヤ・ヒマライカ(Crucihimalaya himalaica)、クルキヒマラヤ・ワリキイ(Crucihimalaya wallichii)、カルダミネ・ネクスオサ(Cardamine nexuosa)、レピジウム・ウイルギニカム(Lepidium virginicum)、カプセラ・ブルサ・パストリス(Capsella bursa pastoris)、オルマラビドプシス・プミラ(Olmarabidopsis pumila)、アラビス・ヒルステ(Arabis hirsute)、ブラシカ・ナプス(Brassica napus)、ブラシカ・オレラケア(Brassica oleracea)、ブラシカ・ラパ(Brassica rapa)、ラファヌス・サチウス(Raphanus sativus)、ブラシカ・ユンカケア(Brassica juncacea)、ブラシカ・ニグラ(Brassica nigra)、エルカ・ウエシカリヤ亜種、サチワ(Eruca vesicaria subsp. sativa)、シトラス・シネンシス(Citrus sinensis)、ジャトロファ・クルカス(Jatropha curcas)、ポプラス・トリコカルパ(Populus trichocarpa)、メジカゴ・トランカツラ(Medicago truncatula)、キケル・ヤマシタエ(Cicer yamashitae)、キケル・ビュガム(Cicer bijugum)、キケル・アリエチナム(Cicer arietinum)、キケル・レチクラタム(Cicer reticulatum)、キケル・ユダイカム(Cicer judaicum)、カヤナス・カヤニフォリウス(Cajanus cajanifolius)、カヤナス・スカラバエオイデス(Cajanus scarabaeoides)、ファセオラス・ウルガリス(Phaseolus vulgaris)、グリキネ・マクス(Glycine max)、ゴシピウム(Gossypium)属種、アストラガラス・シニカス(Astragalus sinicus)、ロータス・ヤボニカス(Lotus japonicas)、トレニア・フォウルニエリ(Torenia fournieri)、アリウム・ケパ(Allium cepa)、アリウム・フィスツロサム(Allium fistulosum)、アリウム・サチウム(Allium sativum)、ヘリアンタス・アヌウス(Helianthus annuus)、ヘリアンタス・ツベロサス(Helianthus tuberosus)、およびアリウム・ツベロサム(Allium tuberosum)からなる群より選択される植物または前述の植物の1つに属するあらゆる変種もしくは亜種に由来する、請求項17記載の方法。

【請求項27】

少なくとも1つの改変植物細胞、または前記少なくとも1つの改変植物細胞を含む少なくとも1つの改変植物組織、器官、もしくは植物体を、トランスジェニック選択マーカー

配列を安定的に組み込むことなく単離する方法であって、

a . 変更すべき少なくとも1つの植物細胞の第1の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第1の部位特異的エフェクターを用いて、少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾を導入することであって、前記少なくとも1つの標的化フレームシフトまたは欠失修飾により、少なくとも1つの表現型選択形質の発現がもたらされる、導入すること；

b . 前記変更すべき少なくとも1つの植物細胞の第2の植物ゲノム標的部位に、少なくとも1つの第2の標的化修飾を導入することであって、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾は、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を前記第2の植物ゲノム標的部位に作成するヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、またはDNA修飾試薬を含む少なくとも1つの第2の部位特異的エフェクターを用いて導入され、前記少なくとも1つの第2の標的化修飾は、前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾の導入と同時にまたは連続して、同じ変更すべき少なくとも1つの植物細胞に、または前記少なくとも1つの第1の標的化修飾を含む少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物体に導入されて、少なくとも1つの改変植物細胞を得る、導入すること；および

c .

i . 前記少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾により前記第1の植物ゲノム標的部位にもたらされた前記少なくとも1つの表現型選択形質を選択することにより、そして任意選択によりさらに

ii . 前記第2の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を選択することにより、

少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体を単離すること、または少なくとも1つのその子孫細胞、組織、器官、もしくは植物を単離すること、

d . 任意選択により、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾および前記少なくとも1つの第2の標的化修飾を含む少なくとも1つの改変植物または植物物質を、関心対象のさらなる植物または植物物質と交配させて、得られた子孫植物または植物物質を分離し、それによって関心対象の遺伝子型を得ることであって、任意選択により、前記関心対象の遺伝子型は、前記少なくとも1つの第1の標的化修飾を含んでいない、交配させることを含む、方法。

【請求項28】

ステップbが、前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位および/または前記少なくとも1つの第2の植物ゲノム標的部位に標的化配列変換または置換を作成するために修復鋳型を導入することをさらに含む、請求項27記載の方法。

【請求項29】

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CasもしくはCpf1ヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、ZFN、メガヌクレアーゼ、アルゴノートヌクレアーゼ、FokIもしくはそのバリエーションを含む制限エンドヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、または2部位特異的ニッキングエンドヌクレアーゼ、あるいは前述のエフェクターのあらゆるバリエーションまたは触媒活性フラグメントの少なくとも1つから選択されるか；

前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターが、CRISPRベースのヌクレアーゼであり、前記CRISPRベースのヌクレアーゼは、部位特異的DNA結合ドメインを含み、前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼまたはそれをコードする核酸配列は、

a . SpCas9、SaCas9、SaKKH-Cas9、VQR-Cas9、St1Cas9を含む、Cas9、

b . Ascpf1、LbCpf1、FnCpf1を含む、Cpf1、

c . CasX、および

d . CasY、

ならびに前述したCRISPRベースのヌクレアーゼの任意のバリエーションおよび誘導体を

含む群より選択され、任意選択により前記少なくとも1つのCRISPRベースのヌクレアーゼは、それぞれの野生型配列と比べて変異を含み、したがって得られたCRISPRベースのヌクレアーゼは、一本鎖特異的DNAニッカーゼに、または全DNA切断能力を失ったDNA結合エフェクターに変換されているか；あるいは

前記少なくとも部位特異的エフェクター、または前記少なくとも1つの部位特異的エフェクターを含む複合体の少なくとも1つの構成要素が、前記少なくとも1つの塩基編集複合体を細胞内小器官に向けるために少なくとも1つの小器官局在化シグナルを含む、請求項27記載の方法。

【請求項30】

前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位が、少なくとも1つの表現型選択形質をコードするゲノム標的部位であり、前記少なくとも1つの表現型選択形質は、抵抗性/耐性形質または成長優位性形質であり、前記少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化塩基修飾は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、もしくは植物、またはその子孫に、加えられる化合物またはトリガに対する抵抗性/耐性または成長優位性を付与する、請求項27記載の方法。

【請求項31】

前記関心対象の少なくとも1つの表現型選択形質が、少なくとも1つの内在性遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、あるいは前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質は、少なくとも1つの導入遺伝子であるかまたはそれによりコードされ、前記少なくとも1つの内在性遺伝子または前記少なくとも1つの導入遺伝子は、前記関心対象の少なくとも1つの表現型形質に前記少なくとも1つの修飾がない細胞を阻害する、損傷する、または殺す植物毒、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型形質をコードし、あるいは前記少なくとも1つの表現型形質は、細胞分裂、成長速度、胚発生のブラスターからなる群より、または非改変細胞、組織、器官、もしくは植物と比べて改変細胞、組織、器官、もしくは植物に優位性を与える別の表現型選択特性から選択される、請求項27記載の方法。

【請求項32】

前記少なくとも1つの第1の植物ゲノム標的部位が、除草剤抵抗性/耐性からなる群より選択される少なくとも1つの表現型選択形質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子または導入遺伝子であり、ここで除草剤抵抗性/耐性は、グリホサートを含むEPSPS阻害剤に対する抵抗性/耐性、グルホシネートを含むグルタミン合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、イミダゾリンまたはスルホニルウレアを含むALSまたはAHAS阻害剤に対する抵抗性/耐性、アリアルオキシフェノキシプロピオネート(FOP)を含むACCase阻害剤に対する抵抗性/耐性、フィトエンデサチュラーゼステップでのカロテノイド生合成阻害剤、4-ヒドロキシフェニル-ピルビン酸-ジオキシゲナーゼ(HPPD)阻害剤、またはほかのカロテノイド生合成標的の阻害剤を含むカロテノイド生合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、セルロース阻害剤に対する抵抗性/耐性、脂質合成阻害剤に対する抵抗性/耐性、長鎖脂肪酸阻害剤に対する抵抗性/耐性、微小管重合阻害剤に対する抵抗性/耐性、光化学系I電子ダイバーターに対する抵抗性/耐性、カルバメート、トリアジン、およびトリアジノンを含む光化学系II阻害剤に対する抵抗性/耐性、PPO阻害剤に対する抵抗性/耐性、ジカンバ(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を含む合成オーキシシンに対する抵抗性/耐性からなる群より選択される、請求項27記載の方法。

【請求項33】

前記少なくとも1つの表現型選択形質が、植物毒抵抗性/耐性形質、好ましくは除草剤抵抗性/耐性形質であり、前記改変すべき少なくとも1つの植物細胞の前記第1の植物ゲノム標的部位の前記少なくとも1つの第1の標的化フレームシフトまたは欠失修飾は、植物毒化合物、好ましくは除草剤に対する抵抗性/耐性を付与し、前記化合物は、前記少なくとも1つの改変植物細胞、組織、器官、もしくは植物体、またはその子孫に加えられる外来性化合物である、請求項27記載の方法。

【請求項 3 4】

前記少なくとも 1 つの表現型選択形質が、少なくとも 1 つの改変植物細胞、組織、器官、または植物体の特定または単離に便利な可視表現型であるか；
 前記少なくとも 1 つの表現型選択形質が光沢表現型であるか；
 前記少なくとも 1 つの表現型選択形質がゴールドデン表現型であるか；
 前記少なくとも 1 つの表現型選択形質が着色表現型であるか；あるいは
 前記少なくとも 1 つの表現型選択形質が成長優位性表現型である、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 記載の方法であるか；、
 請求項 1 7 記載の方法であるか；あるいは、
 請求項 2 7 記載の方法により得ることができる、植物細胞、組織、器官、物質、もしくは植物体、またはその子孫。

【請求項 3 6】

ゲノム編集により遺伝子改変植物を作製する方法であって、
 a) 遺伝子改変すべき植物の細胞または組織を準備するステップ；
 b) 第 1 のゲノム編集系および第 2 のゲノム編集系を準備するステップであって、前記第 1 のゲノム編集系は、植物の選択マーカー遺伝子を標的化し修飾することができ、前記第 2 のゲノム編集系は、前記植物の関心対象の遺伝子を標的化し修飾することができる、ステップ；
 c) 前記第 1 および前記第 2 のゲノム編集系で前記細胞または前記組織を同時形質転換するステップ；
 d) 好ましくは選択圧なしで、前記形質転換細胞または組織から植物を再生させるステップ；
 e) ステップ d) で再生させた植物のなかから、前記選択マーカー遺伝子が修飾されている植物を選択するステップ；および
 f) ステップ e) で選択した植物のなかから、その標的遺伝子が修飾されている植物を特定するステップ
 を含む、方法。

【請求項 3 7】

前記ゲノム編集系が、精密塩基エディター (PBE) 系、CRISPR-Cas9 系、CRISPR-Cpf1 系、CRISPRi 系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系、および TALEN 系から選択される、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記選択マーカー遺伝子の修飾により、前記植物に選択可能な形質が生じ、好ましくは前記選択マーカー遺伝子の前記修飾は、前記植物のほかの形質を変えることがない、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 9】

前記選択形質が除草剤抵抗性であるか；あるいは前記選択形質が、葉舌、葉色、葉蛾などの目視観測できる形質である、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 0】

前記選択マーカー遺伝子が、sbA、ALS、EPSPS、ACCase、PPO、HPPD、PDS、GS、DOXPS、および P450 からなる群より選択されるか；あるいは、

前記選択マーカー遺伝子が、LIG、PDS、zb7、および GL2 からなる群より選択される、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 1】

前記第 1 のゲノム編集系および前記第 2 のゲノム編集系が、精密塩基エディター (PBE) 系である、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 2】

請求項 3 6 から 4 1 のいずれか 1 項記載の方法により得ることができる遺伝子改変植物であって、好ましくは導入遺伝子を含まない、遺伝子改変植物。

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/085829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/82(2006.01); A01H 1/00(2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CPRSABS, CNTXT, CSCD, CJFD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, KRTXT, JPTXT, CPEA, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED: base, editing, marker, without, free, target+, select+, trait, phenotype, breeding, plant, crispr, cas, talen, zfn, APOBEC, XTEN, NLS, PmCDA1, resistan+, tolerance, ALS, AHAS, PPO, PPX, EPSPS, mutation; GenBank, EMBL, DDBJ, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent: sequence search on SEQ ID NOs:25-27		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014165612 A2 (DOW AGROSCIENCES LLC ET AL.) 09 October 2014 (2014-10-09) see claims 1-41, the description, paragraphs 10 and 300	1-46, 81
Y	CN 104388559 A (CHINESE ACAD AGRIC SCI PLANT PROTECTION) 04 March 2015 (2015-03-04) see the description, paragraph 4	26-33
Y	CN 103327809 A (CIBUS US LLC ET AL.) 25 September 2013 (2013-09-25) see the description, paragraphs 7 and 14	34-38
PY	WO 2017123772 A1 (UNIV MINNESOTA ET AL.) 20 July 2017 (2017-07-20) see the claims 1-69	39-41
Y	CN 103608458 A (KEYGENE NV) 26 February 2014 (2014-02-26) see the claims 29, the description, paragraphs 42-50, SEQ ID NOs:5 and 9	39-41
Y	US 2017073670 A1 (NAT UNIV CORP KOBE UNIV) 16 March 2017 (2017-03-16) see the description, paragraphs 11-16, 39	12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 17 July 2018	Date of mailing of the international search report 09 August 2018	
Name and mailing address of the ISA/CN STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer PAN, Junyu Telephone No. 62089155	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/085829

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yuming Lu et al. "Precise Editing of a Target Base in the Rice Genome Using a Modified CRISPR/Cas9 System" <i>Molecular Plant</i> , Vol. 10, No. 3, 05 December 2016 (2016-12-05), ISSN: 1752-9867, pages 523-525, see page 523, left column, the last paragraph to right column, the first paragraph, page 524	1-46, 81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/085829

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Group 1: claims 1-46 and 81 related to a method for isolating at least one modified plant cell or at least one modified plant tissue, organ, or whole plant comprising the at least one modified plant cell, without stably integrating a transgenic selectable marker sequence; and a plant cell, tissue, organ, material or whole plant, or a progeny thereof, obtainable by the method;
- [2] Group 2: claims 47-62 and 82 related to a method for isolating at least one modified plant cell or at least one modified plant tissue, organ, or whole plant comprising the at least one modified plant cell, without stably integrating a transgenic selectable marker sequence; and a plant cell, tissue, organ, material or whole plant, or a progeny thereof, obtainable by the method;
- [3] Group 3: claims 63-80 and 83 related to a method for isolating at least one modified plant cell or at least one modified plant tissue, organ, or whole plant comprising the at least one modified plant cell, without stably integrating a transgenic selectable marker sequence; and a plant cell, tissue, organ, material or whole plant, or a progeny thereof, obtainable by the method;
- [4] Group 4: claims 84-93 related to a method of generating a genetically modified plant by genome editing, and a genetically modified plant obtainable by the method.
- [5] The technical feature shared among groups 1-4 is that isolating a whole plant comprising at least two modifications at at least two plant genomic target sites by selecting for the phenotypically selectable trait caused by at least first modification at at least first plant genomic target site/selectable marker gene. However, WO2014165612A2(09.10.2014) discloses a method of integrating one or more exogenous sequences into the genome of a plant cell, which comprises modifying one or more endogenous loci such that the endogenous gene is mutated to express a product that results in a selectable phenotype in the plant cell; and selecting plant cells that express the selectable phenotype. Therefore, said technical feature shared among groups 1-4 cannot be construed as a special technical feature. Above all, the 4 groups of the invention lack common or corresponding special technical features, and are not linked by a single general inventive concept, hence do not meet the requirements of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1.
1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **claims 1-46 and 81**

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/085829

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2014165612 A2	09 October 2014	JP 2016514480 A	23 May 2016
		RU 2015147236 A3	07 March 2018
		EP 2981166 A4	01 March 2017
		CN 105263312 A	20 January 2016
		WO 2014165612 A3	15 January 2015
		RU 2015147236 A	10 May 2017
		BR 102014008118 A2	06 January 2015
		HK 1214920 A1	12 August 2016
		AU 2014248208 A1	22 October 2015
		CA 2908512 A1	09 October 2014
		US 2014304853 A1	09 October 2014
		ZA 201507414 B	25 January 2017
		EP 2981166 A2	10 February 2016
		KR 20150140723 A	16 December 2015
CN 104388559 A	04 March 2015	CN 104388559 B	13 July 2016
CN 103327809 A	25 September 2013	CN 103327809 B	26 April 2017
		AU 2011285830 A1	21 March 2013
		CN 107384911 A	24 November 2017
		EP 2600710 A4	22 January 2014
		NZ 607627 A	30 October 2015
		EP 2600710 A2	12 June 2013
		JP 6058536 B2	11 January 2017
		JP 2016220685 A	28 December 2016
		CA 2807035 A1	09 February 2012
		CL 2013000341 A1	13 December 2013
		MX 348704 B	26 June 2017
		BR 112013002543 A2	04 July 2017
		KR 20130093615 A	22 August 2013
		JP 2013545434 A	26 December 2013
		AU 2011285830 B2	24 September 2015
		WO 2012018862 A2	09 February 2012
		UA 112969 C2	25 November 2016
		WO 2012018862 A3	31 May 2012
		EA 201390034 A1	30 September 2013
		ZA 201301067 B	30 August 2017
		IN 188MUN2013 A	29 May 2015
		MX 2013001299 A	28 October 2013
WO 2017123772 A1	20 July 2017	None	
CN 103608458 A	26 February 2014	JP 2014516517 A	17 July 2014
		US 9624506 B2	18 April 2017
		CA 2833613 A1	01 November 2012
		EP 2702157 A1	05 March 2014
		US 2017240916 A1	24 August 2017
		WO 2012148275 A1	01 November 2012
		US 2014206850 A1	24 July 2014
		US 2015191741 A1	09 July 2015
US 2017073670 A1	16 March 2017	WO 2015133554 A1	11 September 2015
		EP 3115457 A1	11 January 2017
		SG 11201609211V A	29 December 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/085829

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 2947941 A1	11 September 2015
		EP 3115457 A4	09 August 2017
		JP 6206893 B2	04 October 2017
		JP WO2015133554 A1	06 April 2017
		JP 2018019705 A	08 February 2018
		CN 106459957 A	22 February 2017

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 Z

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 100114890
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(74) 代理人 100098501
弁理士 森田 拓

(74) 代理人 100116403
弁理士 前川 純一

(74) 代理人 100135633
弁理士 二宮 浩康

(74) 代理人 100162880
弁理士 上島 類

(72) 発明者 ツァイシア ガオ
中華人民共和国 ペキン チャオヤン・ディストリクト ウェスト ベイチェン ロード ナンバー 1

(72) 発明者 ルイ チェン
中華人民共和国 ペキン チャオヤン・ディストリクト ウェスト ベイチェン ロード ナンバー 1

(72) 発明者 ジンシン リウ
中華人民共和国 ペキン チャオヤン・ディストリクト ウェスト ベイチェン ロード ナンバー 1

(72) 発明者 アーロン ハメル
アメリカ合衆国 ミズーリ セントルイス マーケア ドライブ 1 2 6 3 0

(72) 発明者 ザリル ヴァグチヒパワラ
アメリカ合衆国 ミズーリ ボールウィン ウッドグリーン ドライブ 3 4 5

(72) 発明者 マティアス ラープス
アメリカ合衆国 ミズーリ フロンテナック アンザイガー アヴェニュー 1 0 4 2 4

F ターム (参考) 2B030 AA02 AB03 CA11 CB02
4B064 AF27 BJ10 CA11 CA19 CA21 CC24 DA10 DA11