

明 細 書

発明の名称：

植物細胞への物質導入方法、遺伝子改変植物又は植物細胞及びこれらの製造方法、並びに植物細胞への物質導入装置の制御プログラム

技術分野

[0001] 本開示は、植物細胞への物質導入方法、遺伝子改変植物又は植物細胞及びこれらの製造方法、並びに植物細胞への物質導入装置の制御プログラムに関する。

背景技術

[0002] CRISPR-Cas9システム等のゲノム編集ツールは、生物個体の遺伝子改変に簡便に用いられることが期待される。特に、植物個体へのゲノム編集ツールの導入方法として、例えば、特許文献1、2に記載されるナノピペットを用いたインジェクション方法、特許文献3、4に記載されるパーティクルガン法による金粒子とゲノム編集ツールとの複合体の植物個体への導入方法（iPB（in planta Particle Bombardment）法）等を検討することができる。iPB法は、ゲノム編集ツールが導入される細胞がランダムとなり、また導入細胞や導入物質へのダメージ発生が考えられ、遺伝子改変効率の安定性や植物個体への侵襲性が懸念される。ナノピペットを用いたインジェクション方法は、遺伝子改変効率の向上した安定性や低侵襲性が期待されるが、植物に特化したインジェクション条件が確立されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1：国際公開第2014／160036号
特許文献2：国際公開第2013／012452号
特許文献3：特開2017－205103号公報
特許文献4：特開2017－205104号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本開示は、ナノピペットを用いた植物細胞へのインジェクション方法において、植物に特化したインジェクション条件を確立し、自動制御された植物細胞へのインジェクションシステムを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] [1]

以下を含む、植物細胞への物質導入方法：

- a) 物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付ける工程；
- b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程；
- c) ナノピペットを1 μm 以上50 μm 以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程；
- d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程；及び
- e) ナノピペットを抜去する工程。

[2]

前記物質が、タンパク質、タンパク質を含む混合物又は複合体、タンパク質及び核酸を含む混合物又は複合体、核酸、又は色素である、上記[1]に記載の方法。

[3]

前記物質が、ゲノム編集用物質である、上記[2]に記載の方法。

[4]

前記物質が、正帯電性物質又は負帯電性物質であり、

前記物質が正帯電性物質である場合に、工程d)が、ナノピペットの内部が正電位となり、電解液が負電位となるように電圧を印加することにより行

われ、

前記物質が負帯電性物質である場合に、工程 d) が、ナノピペットの内部が負電位となり、電解液が正電位となるように電圧を印加することにより行われる、

上記〔2〕に記載の方法。

〔5〕

工程 d) が、 -1.1 V 以上 $+1.1\text{ V}$ 以下の設定印加電圧及び 0.1 秒 以上 10.0 秒 以下の設定印加時間で電圧を印加することにより行われる、

上記〔4〕に記載の方法。

〔6〕

以下を含む、遺伝子改変植物又は植物細胞の製造方法：

- a) 遺伝子改変用物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程；
- b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が 2% 以上 50% 以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程；
- c) ナノピペットを $1\text{ }\mu\text{ m}$ 以上 $50\text{ }\mu\text{ m}$ 以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程；
- d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程；及び
- e) ナノピペットを抜去する工程。

〔7〕

以下を含む方法により製造される、遺伝子改変植物又は植物細胞：

- a) 遺伝子改変用物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程；
- b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が 2% 以上 50% 以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程；

- c) ナノピペットを1 μm 以上50 μm 以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程；
- d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程；及び
- e) ナノピペットを抜去する工程。

[8]

以下を行うための命令を含む、植物細胞への物質導入装置の制御プログラム：

- a) 遺伝子改変用物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程；
- b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程；
- c) ナノピペットを1 μm 以上50 μm 以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程；
- d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程；及び
- e) ナノピペットを抜去する工程。

発明の効果

[0006] 本開示によれば、ナノピペットを用いた植物細胞へのインジェクション方法において、植物に特化したインジェクション条件を確立し、自動制御された植物細胞へのインジェクションシステムを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]本開示の方法に用いるためのシステム及び本開示の方法におけるピペットアプローチ工程の概念図である。

[図2]本開示の方法におけるピペット穿刺工程の概念図である。

[図3]本開示の方法におけるピペット物質排出工程の概念図である。

[図4]本開示の方法に用いるためのシステムの制御機構の例を示す図である。

[図5]本開示の方法でゲノム編集されたイネカルの写真を示す。上図及び下図は、それぞれ別の2つのサンプルを示す。右図では、白色化部分を枠で表示している。

[図6]本開示の方法でゲノム編集されたオオムギ植物個体の写真を示す。下図は、上図の拡大写真を示す。右図では、白色化部分を枠で表示している。

[図7]インジェクション電圧の各条件に応じて本開示の方法で試薬溶液を導入したオオムギの生存率を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0008] 以下、必要に応じて図面を参照しながら、本発明を詳細に説明するが、図面は本発明を説明するための例示であり、本発明の技術的範囲は図面による例示により限定されるものではない。

[0009] [植物細胞への物質導入システム]

本開示の方法（植物細胞への物質導入方法及び遺伝子改変植物細胞の製造方法）に用いるためのシステム（植物細胞への物質導入システム、以下「本開示のシステム」という。）を説明する。本開示のシステムは、例えば、以下の構成要素を含む。

- ・ ナノピペット；
- ・ ナノピペットを三次元（便宜上「x y z」ということがある。）方向に移動させるための三次元（x y z）移動ピペットホルダ；
- ・ ナノピペットの内部に充填された液体と接触可能な電極（以下、「ピペット電極」という。）；
- ・ 細胞保持具中の電解液と接触可能な電極（以下、「リファレンス電極」という。）；
- ・ ピペット電極とリファレンス電極との間の電流を測定するための電流測定回路；
- ・ ピペット電極とリファレンス電極との間に電圧を印加するための電圧印加回路。

[0010] また、本開示のシステムは、三次元移動モジュールを手動入力によって移

動させるための位置入力装置をさらに含んでもよい。本開示のシステムは、光学顕微鏡に装着して用いられる。また、本開示のシステムは、植物細胞及び植物細胞を浸漬する電解液を保持する細胞保持具を光学顕微鏡上に設置し、かつ植物細胞に導入される物質を含有する溶液をナノピペット内部に保持させて用いられる。

[0011] 以下、各構成要素について説明する。

[0012] (ナノピペット)

「ナノピペット」とは、ナノスケールの先端開口を有する管状構造体をいう。ナノスケールの先端開口とは、例えば、約10nm～約500nm、好ましくは約50nm(±20%)の円錐状の先端開口(即ち、ナノポア)である。ナノピペットの材料としては、不活性の非生物学的材料、例えば、ガラス又は石英等が用いられる。また、ナノピペットの内壁は、ナノピペットの内部に充填される物質(例、核酸、タンパク質)の吸着を抑制するように表面処理されてもよい。また、ナノピペットは、ナノピペットの内部にナノピペット内の溶液に接触する電極を挿入できるような形状又はスケールを有することが好ましい。

[0013] ナノピペットは、管内に単一の流路(「バレル(barrel)」又は「ポア(bore)」ということがある。)又は複数の平行した流路を有する。管内に単一の流路を有するナノピペットを、「シングルバレル型ナノピペット(single-barreled nanopipette)」ということがある。また、管内に複数の平行した流路を有するナノピペットを、「マルチバレル型ナノピペット(multi-barreled nanopipette)」ということがある。また、管内に2本の平行した流路を有するナノピペットを、「ダブルバレル型ナノピペット(double-barreled nanopipette)」ということがある。本開示の方法で用いるナノピペットは、ナノピペット内への物質の充填操作の容易性及び確実性、電流測定及び電圧印加の正確性の観点から、シングルバレル型ナノピペットが好ましい。

[0014] ナノピペットは、市販品として入手可能である（例、YOKOGAWA製、品番SU10ACC-NP01等）。また、ナノピペットは、例えば、レーザでガラス又は石英製の毛細管を引っ張って作製することができる。

[0015] ナノピペットの詳細は、例えば、特許文献1（国際公開第2014/160036号）及び特許文献2（国際公開第2013/012452号）に記載されている。

[0016] （三次元（xyz）移動ピペットホルダ）

「三次元（xyz）移動ピペットホルダ」とは、ナノピペットが装着され、ラフ・アクチュエータ及びファイン・アクチュエータの駆動により、装着したナノピペットを三次元方向に移動させるピペットホルダである。三次元方向のうち、2方向（便宜上「x軸方向」及び「y軸方向」ということがある。）がナノピペットの長軸に対して垂直又は垂直に近い方向となり、残りの1方向（便宜上「z軸方向」ということがある。）がナノピペットの長軸と平行又は平行に近い方向となるように、三次元移動ピペットホルダに装着される。三次元移動ピペットホルダは、例えば、ラフ・アクチュエータで駆動されるホルダステージ及びファイン・アクチュエータで駆動され、ホルダステージ上に搭載されかつナノピペットが装着されるホルダヘッドから構成されてもよい。

[0017] 「ラフ・アクチュエータ」とは、ラフな位置付けが可能な三次元アクチュエータであり、例えば、ストロークが10～100mmオーダー程度、設定分解能が0.1～1μmオーダー程度の三次元アクチュエータが挙げられる。ラフ・アクチュエータとしては、例えば、モーター（回転式モーター、リニアモーター）ベースのアクチュエータ等の電磁気力駆動アクチュエータ等が挙げられる。

[0018] 「ファイン・アクチュエータ」とは、ファインな位置付けが可能な三次元アクチュエータであり、例えば、ストロークが100～500μmオーダー程度、設定分解能が1nmオーダー程度の三次元アクチュエータが挙げられる。ファイン・アクチュエータとしては、例えば、 piezo素子ベースのアク

チュエータ等のピエゾ効果駆動アクチュエータ等が挙げられる。なお、ラフ・アクチュエータのXY軸設定分解能がターゲットとする細胞サイズに対して十分な性能を有していれば、ファイン・アクチュエータは細胞への精密なアプローチと穿刺に特化してZ軸のみの1次元に限定してもよい。

[0019] (位置入力装置)

位置入力装置は、ナノピペットの位置付けを手動入力で指示するための装置である。位置入力装置としては、例えば、ジョイスティック等のポインティング装置、キーボード等のキー入力装置、これらの併用等が挙げられる。

[0020] (ピペット電極、リファレンス電極)

ピペット電極及びリファレンス電極としては、例えば、金製電極、銀製電極(例、銀テトラキス(4-クロロフェニル)ボレート(AgTBACl)電極、Ag/AgCl電極等)、白金製電極等が挙げられる。リファレンス電極は、細胞保持具で電解液に接触するように用いてもよい。また、ナノピペットがマルチバレル型(例、ダブルバレル型)ナノピペットである場合、ピペット電極は、植物細胞に導入される物質が保持される流路中に設置され、リファレンス電極は、別の流路中に設置されてもよい。

[0021] (電流測定回路、電圧印加回路)

電流測定回路は、ピペット電極とリファレンス電極との間のイオン電流(即ち、ナノピペット内部と電解液間の電流)を測定するための回路である。電流測定回路は、100pA~100nAオーダー程度の電流測定範囲を有し、細胞表面検出にあたっては2%~50%くらいまでの電流変化(低減)を測定可能な回路が好ましい。例えば、細胞表面から十分離れた時点での電流(定常電流)が10nAとなるケースにおいて、細胞表面の検出を電流の20%低下と設定した場合、8nAとなる点を測定する。また非常に小さな定常基準電流と、その変化を正確に検出するために、低雑音増幅回路等が挙げられる。また、ソフトウェアによるデジタルフィルタ技術を使用して低ノイズを実現する場合もある。

[0022] 電流測定回路により測定される電流は、走査型イオンコンダクタンス顕微

鏡（S I C M）技術の原理により、細胞とナノピペットの先端との間の距離の指標として用いられる。ナノピペットの先端が、細胞保持具中の電解液中に接液すると、リファレンス電極との間にイオン電流が流れ始める。次いで、ナノピペットの先端を細胞に近づくように移動させても、細胞表面からの距離が十分あるときは電流値に大きな変化はない。この時の電流値を、「定常電流」という。その後、ナノピペットの先端が細胞に極めて近い距離に接近すると、細胞とナノピペットの先端との間の距離に応じて電流が急激に低下する。これは、細胞膜が高度な絶縁膜であることによるものである。そこで、電流の定常電流からの低下率が、予め設定された値（以下、「設定電流低下率」という。）になる時にナノピペットが一時停止するように自動制御することで、ナノピペットの先端を細胞の直近で自動一時停止させることができる。

[0023] （電圧印加回路）

電圧印加回路は、ピペット電極とリファレンス電極との間（ナノピペット内部と電解液間）に電圧を印加させるための回路である。電圧印加回路は、 $-11 \sim +11$ V オーダー程度の電圧を 0.01 秒オーダー程度の時間制御で印加可能な回路が好ましい。

[0024] （植物細胞）

本開示の方法は、植物細胞に適用可能である。植物細胞の形態としては、特に限定されず、培養細胞であってもよく、カルス、種子、スプラウト、植物組織、植物組織片等の中に存在する細胞であってもよい。植物組織としては、例えば、スプラウトの茎頂分裂組織（例、L2層等）等が挙げられる。

[0025] （細胞保持具）

植物細胞を保持するための細胞保持具としては、特に限定されないが、通常は、上部が開放可能な透明な保持具が用いられる。このような保持具としては、例えば、細胞培養ディッシュ、マルチウェルプレート等の上部が開放可能な蓋で覆われた細胞培養容器、スライドガラス等の平板等が挙げられる。

[0026] (細胞浸漬電解液)

細胞保持具中で細胞を浸漬する電解液としては、例えば、液体培地（例、ムラシゲ・スクーグ（MS培地）、GAMBORG B5培地、チュー（Chu）（N6）培地）、緩衝生理食塩水（例、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、HEPES緩衝生理食塩水（HBS）、ハンクス平衡塩溶液（HBSS）等）が挙げられる。

[0027] (植物細胞に導入される物質)

植物細胞に導入される物質としては、特に限定されないが、例えば、タンパク質、タンパク質を含む混合物又は複合体、タンパク質及び核酸を含む混合物又は複合体、核酸、及び色素等が挙げられる。植物細胞に導入される物質は、特に限定されないが、電解質溶液に溶解または懸濁する物質が好ましい。また、帯電性物質であることが好ましい。帯電性物質は、単一の帯電した物質であってもよく、複数の物質の混合物又は複合体であって、全体として帯電した混合物又は複合体であってもよく、電解質溶液に溶解または懸濁した時に溶液全体として帯電させる物質（単一物質又は複数の物質の混合物若しくは複合体）であってもよい。帯電性物質としては、正帯電性物質及び負帯電性物質が挙げられる。植物細胞に導入される物質（例、タンパク質、タンパク質を含む混合物又は複合体、タンパク質及び核酸を含む混合物又は複合体、核酸、及び色素等）は、正帯電性物質又は負帯電性物質のいずれかになることが好ましい。例えば、タンパク質、タンパク質の混合物又は複合体、核酸及びタンパク質を含む混合物又は複合体等は、正帯電性物質又は負帯電性物質のいずれかになってもよく、例えば、正帯電性物質になってもよい。核酸及びタンパク質を含む混合物又は複合体としては、例えば、ゲノム編集用物質等が挙げられる。ゲノム編集用物質としては、CRISPR-Cas9、CRISPR-Cas3、ZFN、TALEN、PPRのシステム等が挙げられる。また、例えば、核酸（例、DNA、RNA等）等は、正帯電性物質又は負帯電性物質のいずれかになってもよく、例えば、負帯電性物質になってもよい。また、植物細胞に導入される物質は、色素等のマーカー

物質であってもよく、マーカー物質を含んでもよい。

[0028] 植物細胞に導入される物質は、通常、液体（例、溶液）の形態である。植物細胞に導入される物質が溶液である場合、溶媒としては、水性電解液、非水性電解液が挙げられるが、水性電解液であることが好ましい。水性電解液としては、例えば、上記で細胞を浸漬する電解液として例示したものが挙げられる。

[0029] [植物細胞への物質導入方法]

本開示の植物細胞への物質導入方法は、以下の工程を含む。

- a) 物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付ける工程（ピペット位置付け工程）；
- b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程（ピペットアプローチ工程）；
- c) ナノピペットを1 μm 以上50 μm 以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程（ピペット穿刺工程）；
- d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程（物質排出工程）；及び
- e) ナノピペットを抜去する工程（ピペット抜去工程）。

[0030] (工程a)：ピペット位置付け工程)

工程a)は、物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付ける工程である。物質をナノピペットの内部に充填する方法としては、例えば、遠心法、吸引法等が挙げられる。遠心法は、ナノピペットを遠心用ホルダに装着し、ナノピペットの根本開口から物質を充填し、ナノピペットを装着した遠心用ホルダを遠心機で遠心することによって行ってもよい。吸引法は、先端開口から物質を吸引することによって行ってもよい。物質を内部に充填したナノピペットは、位置付けを行うために、例えば、上記で説明した三次元(x y z)移動ピペットホルダに装着してもよい。「植物細胞対応位置」とは、対象とする植物細胞の存在位置から「z軸」上に存在

する位置をいう。位置付けは、ラフ・アクチュエータ、ファイン・アクチュエータ、及びこれらの併用のいずれで行ってもよい。ラフ・アクチュエータ及びファイン・アクチュエータの駆動は、位置入力装置を介した手動制御又はプログラムによる自動制御により行ってもよい。さらには、X Y軸については顕微鏡のステージを使って位置付けする方法もある。

[0031] (工程b) : ピペットアプローチ工程)

工程b) は、ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が設定電流低下率となる位置 (図1における「ピペット一時停止位置 (P2) 」) まで、細胞方向に移動する工程である。「植物細胞にアプローチする方向」とは、「z軸」上の植物細胞側に向かう方向をいう。ナノピペット内部と電解液間の電流 (イオン電流) は、ピペット電極とリファレンス電極との間の電流として、電流測定回路により測定することができる。また、工程b) では、電流を測定するため、ナノピペット内部と電解液間 (即ち、ピペット電極とリファレンス電極との間) に、電気浸透流によって充填液が流れ出さない程度に設定した低電圧 (設定アプローチ電圧) を印加することが好ましい。ナノピペット内部と電解液間の電流の変化を、図1を参照して説明する。ナノピペットの先端が電解液外に位置する時、ナノピペット内部と電解液間是非接続状態となり、電流 (I) はゼロ (I_0) となる。ナノピペットの先端が電解液表面位置 (P0) に到達し、電解液に入ると、ナノピペット内部と電解液間は接続状態となるので、電流 (I) は上昇する。その後しばらくの間は、ナノピペットを進行させても、電流 (I) は大きな変化がなく定常状態となる。この時の電流 (I) を、定常電流 (I_1) とする。ナノピペットの先端が細胞表面位置 (P3) に極めて近い距離の位置 (「電流降下開始点位置 (P1) 」) に到達すると、細胞とナノピペットの先端との間の距離に応じて電流が急激に低下し始める。その後、電流 (I) が定常電流 (I_1) から設定電流低下率 (R) 低下した電流 (I_2) となる位置 (「ピペット一時停止位置 (P2) 」) まで、ナノピペットを進行させる。ナノピペットは、ピペット一時停止位置 (P2) で一時停止して

もよい。工程 b) におけるナノピペットの移動は、ラフ・アクチュエータ、ファイン・アクチュエータ、及びこれらの併用のいずれで行ってもよい。少なくとも、電流降下開始点位置 (P 1) 以降の移動は、ファイン・アクチュエータで行うことが好ましい。工程 b) におけるナノピペットの移動は、プログラムによる自動制御により行うことが好ましい。植物種に応じて設定電流低下率を予め設定することにより、細胞に対するダメージの抑制及び細胞内への高効率での物質導入を達成することが可能となる。

[0032] <設定電流低下率 (Current Drop Rate) >

設定電流低下率は、植物細胞のために最適化された値が用いられる。設定電流低下率の値は、好ましくは 2 ~ 50 %、より好ましくは 3 ~ 40 %、最も好ましくは 5 ~ 20 % である。さらに、設定電流低下率は、下記の「設定パラメータの例」に記載されるような、植物種に応じて最適化された値を用いることができる。

[0033] <設定アプローチ電圧 (Approach Voltage) >

設定アプローチ電圧は、植物細胞のために最適化された値が用いられる。設定アプローチ電圧の値は、好ましくは -2 ~ +2 V、より好ましくは -1.0 ~ +1.0 V である。さらに、設定アプローチ電圧は、下記の「設定パラメータの例」に記載されるような、植物種に応じて最適化された値を用いることができる。

[0034] (工程 c) : ピペット穿刺工程)

工程 c) は、前記ナノピペットを前記位置 (即ち、ピペット一時停止位置 (P 2)) から設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程である。「細胞方向に」とは、「z 軸」上の植物細胞側 (植物細胞の内部側) に向かう方向をいう。ピペット穿刺工程でのナノピペットの移動は、通常、プログラムによる自動制御によりファイン・アクチュエータで行われる。また、ピペット穿刺工程でのナノピペットの移動は、ピペットアプローチ工程よりも高速の移動速度で行われることが好ましい。植物種に応じて穿刺距離を予め設定することにより、細胞に対するダメージの抑制及び細胞内への

高効率での物質導入を達成することが可能となる。

[0035] <設定穿刺距離 (Penetration Distance)>

設定穿刺距離は、植物細胞のために最適化された値が用いられる。設定穿刺距離の値は、好ましくは $1 \sim 50 \mu\text{m}$ 、より好ましくは $3 \sim 40 \mu\text{m}$ である。さらに、設定穿刺距離は、下記の「設定パラメータの例」に記載されるような、植物種に応じて最適化された値を用いることができる。遺伝子改変植物を得るためにゲノム編集用物質を導入する場合には、その茎頂分裂組織のL2層へ到達できる穿刺距離に設定することが好ましい。

[0036] (工程d) : 物質排出工程)

工程d)は、ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程である。植物細胞に導入される物質の種類(例、タンパク質、タンパク質を含む混合物又は複合体、タンパク質及び核酸を含む混合物又は複合体、核酸、及び色素等)に応じて、電圧は、ナノピペットの内部が正電位となり、電解液が負電位となるように、あるいは、ナノピペットの内部が負電位となり、電解液が正電位となるように印加される。植物細胞に導入される物質が正帯電性物質である場合に、電圧は、ナノピペットの内部が正電位となり、電解液が負電位となるように印加される。また、植物細胞に導入される物質が負帯電性物質である場合に、電圧は、ナノピペットの内部が負電位となり、電解液が正電位となるように印加される。電圧の印加は、設定インジェクション電圧(設定印加電圧： V_1)及び設定インジェクション時間(設定印加時間： T_1)で行うことが好ましい。

[0037] <設定インジェクション電圧 (Injection Voltage)>

設定インジェクション電圧は、植物細胞のために最適化された値が用いられる。設定インジェクション電圧の値は、正帯電性物質の場合は、好ましくは $-11 \sim +11 \text{ V}$ 、より好ましくは $-10 \sim +10 \text{ V}$ 、最も好ましくは $4 \text{ V} \sim 10 \text{ V}$ である。さらに、設定インジェクション電圧は、下記の「設定パラメータの例」に記載されるような、植物種に応じて最適化された値を用いることができる。

[0038] <設定インジェクション時間 (I n j e c t i o n T i m e) >

設定インジェクション時間は、植物細胞のために最適化された値が用いられる。設定インジェクション時間の値は、好ましくは0. 1～10秒、より好ましくは0. 5～5. 0秒である。さらに、設定インジェクション時間は、下記の「設定パラメータの例」に記載されるような、植物種に応じて最適化された値を用いることができる。

[0039] (工程e) : ピペット抜去工程)

工程e) は、ナノピペットを抜去する工程である。「植物細胞から離れる方向」とは、「z軸」上の植物細胞(植物細胞の内部)から離れる方向をいう。ナノピペットの移動は、設定抜去距離で行われてもよい。ピペット抜去工程でのナノピペットの移動は、通常、プログラムによる自動制御によりファイン・アクチュエータで行われる。

[0040] <設定抜去距離 (R e t r a c t i o n D i s t a n c e) >

設定抜去距離は、植物細胞のために最適化された値が用いられる。設定抜去距離の値は、40 μ m以上の範囲内であることが好ましい。設定穿刺距離は、全植物種に対して上記の値を用いることができる。

[0041] [遺伝子改変植物又は植物細胞の製造方法]

本開示の方法は、遺伝子改変植物又は植物細胞の製造方法としても用いることができる。本開示の遺伝子改変植物又は植物細胞の製造方法は、以下の工程を含む。

- a) 遺伝子改変用物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程(ピペット位置付け工程) ;
- b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程(ピペットアプローチ工程) ;
- c) ナノピペットを1 μ m以上50 μ m以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程(ピペット穿刺工程) ;
- d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出

する工程（物質排出工程）；及び

e) ナノピペットを抜去する工程（ピペット抜去工程）。

[0042] 遺伝子改変用物質としては、正帯電した遺伝子改変用物質及び負帯電した遺伝子改変用物質が挙げられる。正帯電した遺伝子改変用物質としては、例えば、タンパク質及び核酸を含む混合物又は複合体をベースとした遺伝子改変用物質が挙げられ、例えば、ゲノム編集用物質（例、CRISPR-Cas9システムとして用いられるCas9-sgRNA-RNP複合体の他、CRISPR-Cas3、ZFN、TALEN、PPR等のゲノム編集システムで用いられる物質）等が挙げられる。負帯電した遺伝子改変用物質としては、例えば、核酸（DNA、RNA）等が挙げられる。核酸としては、例えば、プラスミドベクター等のDNA、アンチセンスRNA、siRNA等のRNA等が挙げられる。

[0043] 遺伝子改変植物又は植物細胞の製造方法の諸条件は、本開示の植物細胞への物質導入方法で説明した条件を用いることができる。

[0044] [植物細胞への物質導入装置の制御プログラム]

本開示は、植物細胞への物質導入装置の制御プログラムについても提供する。本開示のプログラムは、以下の工程を行うための命令を含む。

a) 遺伝子改変用物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程（ピペット位置付け工程）；

b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程（ピペットアプローチ工程）；

c) ナノピペットを1 μm 以上50 μm 以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程（ピペット穿刺工程）；

d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程（物質排出工程）及び

e) ナノピペットを抜去する工程（ピペット抜去工程）。

[0045] 本開示のプログラムは、さらに、アプローチ電圧、インジェクション電圧

(印加電圧)、インジェクション時間(印加時間)、及び抜去距離を制御する命令を含んでもよい。

[0046] 本開示のプログラムで制御される諸条件は、本開示の植物細胞への物質導入方法で説明した条件を用いることができる。

[0047] [設定パラメータの例]

[正常電性物質導入用設定パラメータの例]

<植物全般>

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5 V、より好ましくは0.8～1.2 V、最も好ましくは1 V

インジェクション電圧：好ましくは2～11 V、より好ましくは3～10.5 V、最も好ましくは4 V～10 V

電流低下率：好ましくは13～21%、より好ましくは13.5～20.5%、最も好ましくは14～20%

穿刺距離：好ましくは8～32 μm 、より好ましくは9～31 μm 、最も好ましくは10～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～6秒、より好ましくは0.8～6秒、最も好ましくは1～5秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0048] <アブラナ科(B r a s s i c a c e a e) >

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5 V、より好ましくは0.8～1.2 V、最も好ましくは1 V

インジェクション電圧：好ましくは4～11 V、より好ましくは4.5～10.5 V、最も好ましくは5 V～10 V

電流低下率：好ましくは13～21%、より好ましくは13.5～20.5%、最も好ましくは14～20%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～5.5秒、より好ましくは0.

8～5.2秒、最も好ましくは1～5秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最

も好ましくは50 μm

[0049] <<ダイコン属 (Raphanus) >>

・例：ダイコン (カイワレダイコン) (Raphanus sativus
var. hortensis)

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5V、より好ましくは0.8～1.
2V、最も好ましくは1V

インジェクション電圧：好ましくは4～6V、より好ましくは4.5～5.
5V、最も好ましくは5V

電流低下率：好ましくは13～21%、より好ましくは13.5～20.5
%、最も好ましくは14～20%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最
も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.
8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最
も好ましくは50 μm

[0050] <イネ科 (Poaceae) >

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5V、より好ましくは0.8～1.
2V、最も好ましくは1V

インジェクション電圧：好ましくは4～11V、より好ましくは4.55～
10.5V、最も好ましくは5～10V

電流低下率：好ましくは13～21%、より好ましくは13.5～20.5
%、最も好ましくは14～20%

穿刺距離：好ましくは8～42 μm 、より好ましくは9～41 μm 、最も好
ましくは10～40 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.

8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最

も好ましくは50 μm

[0051] <<オオムギ属 (Hordeum) >>

・例：オオムギ (Hordeum vulgare)

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5V、より好ましくは0.8～1

.2V、最も好ましくは1V

インジェクション電圧：好ましくは2～8V、より好ましくは3～7V、最

も好ましくは4～5V

電流低下率：好ましくは13～15%、より好ましくは13.5～14.5

%, 最も好ましくは14%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最

も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～6秒、より好ましくは1～6秒

、最も好ましくは3～5秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最

も好ましくは50 μm

[0052] <<トウモロコシ属 (Zea) >>

・例：トウモロコシ (Zea mays)

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5V、より好ましくは0.8～1

.2V、最も好ましくは1V

インジェクション電圧：好ましくは6～11V、より好ましくは6.5～1

0.5V、最も好ましくは7～10V

電流低下率：好ましくは13～21%、より好ましくは13.5～20.5

%, 最も好ましくは14～20%

穿刺距離：好ましくは18～42 μm 、より好ましくは19～41 μm 、最

も好ましくは20～40 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.

8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最

も好ましくは50 μm

[0053] <ナス科 (Solanaceae)>

・例：ナス属 (Solanum)

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5V、より好ましくは0.8～1

.2V、最も好ましくは1V

インジェクション電圧：好ましくは4～8V、より好ましくは4.5～8.

5V、最も好ましくは5～7V

電流低下率：好ましくは13～21%、より好ましくは13.5～20.5

%、最も好ましくは14～20%

穿刺距離：好ましくは8～32 μm 、より好ましくは9～31 μm 、最も好

ましくは10～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.

8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最

も好ましくは50 μm

[0054] ・例：トマト (Solanum lycopersicum)

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5V、より好ましくは0.8～1

.2V、最も好ましくは1V

インジェクション電圧：好ましくは4～8V、より好ましくは4.5～8.

5V、最も好ましくは5～7V

電流低下率：好ましくは13～15%、より好ましくは13.5～14.5

%、最も好ましくは14%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最

も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは2.5～3.5秒、より好ましくは2.

8～3. 2秒、最も好ましくは3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0055] ・例：ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)

アプローチ電圧：好ましくは0.5～1.5 V、より好ましくは0.8～1.2 V、最も好ましくは1 V

インジェクション電圧：好ましくは4～8 V、より好ましくは4.5～8.5 V、最も好ましくは5～7 V

電流低下率：好ましくは19～21%、より好ましくは19.5～20.5%、最も好ましくは20%

穿刺距離：好ましくは8～32 μm 、より好ましくは9～31 μm 、最も好ましくは10～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0056] [負帯電性物質導入用設定パラメータの例]

<植物全般>

アプローチ電圧：好ましくは-0.3～-0.7 V、より好ましくは-0.4～-0.6 V、最も好ましくは-0.5 V

インジェクション電圧：好ましくは-2～-11 V、より好ましくは-2.5～-10.5 V、最も好ましくは-3～-10 V

電流低下率：好ましくは9～21%、より好ましくは9.5～20.5%、最も好ましくは10～20%

穿刺距離：好ましくは8～32 μm 、より好ましくは9～31 μm 、最も好ましくは10～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.3～3.5秒、より好ましくは0.4～3.2秒、最も好ましくは0.5～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0057] <アブラナ科 (Brassicaceae) >

・例：ダイコン属 (Raphanus) >>

・例：ダイコン (カイワレダイコン) (Raphanus sativus var. hortensis)

アプローチ電圧：好ましくは-0.3～-0.7 V、より好ましくは-0.4～-0.6 V、最も好ましくは-0.5 V

インジェクション電圧：好ましくは-2～-8 V、より好ましくは-2.5～-7.5 V、最も好ましくは-5～-7 V

電流低下率：好ましくは13～21%、より好ましくは13.5～20.5%、最も好ましくは14～20%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0058] <イネ科 (Poaceae) >

アプローチ電圧：好ましくは-0.3～-0.7 V、より好ましくは-0.4～-0.6 V、最も好ましくは-0.5 V

インジェクション電圧：好ましくは-3～-8 V、より好ましくは-3.5～-7.5 V、最も好ましくは-4～-7 V

電流低下率：好ましくは13～15%、より好ましくは13.5～14.5%、最も好ましくは14%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0059] <<オオムギ属 (Hordeum) >>

・例：オオムギ (Hordeum vulgare)

アプローチ電圧：好ましくは-0.3～-0.7V、より好ましくは-0.4～-0.6V、最も好ましくは-0.5V

インジェクション電圧：好ましくは-3～-8V、より好ましくは-3.5～-7.5V、最も好ましくは-4～-7V

電流低下率：好ましくは13～15%、より好ましくは13.5～14.5%、最も好ましくは14%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0060] <ナス科 (Solanaceae) >

・例：ナス属 (Solanum)

アプローチ電圧：好ましくは-0.3～-0.7V、より好ましくは-0.4～-0.6V、最も好ましくは-0.5V

インジェクション電圧：好ましくは-6～-11V、より好ましくは-6.5～-10.5V、最も好ましくは-7～-10V

電流低下率：好ましくは9～15%、より好ましくは9.5～14.5%、最も好ましくは10～14%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

8～3. 2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0061] ・例：トマト (*Solanum lycopersicum*)

アプローチ電圧：好ましくは-0.3～-0.7 V、より好ましくは-0.4～-0.6 V、最も好ましくは-0.5 V

インジェクション電圧：好ましくは-6～-11 V、より好ましくは-6.5～-10.5 V、最も好ましくは-7～-10 V

電流低下率：好ましくは13～15%、より好ましくは13.5～14.5%、最も好ましくは14%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最も好ましくは50 μm

[0062] ・例：ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)

アプローチ電圧：好ましくは-0.3～-0.7 V、より好ましくは-0.4～-0.6 V、最も好ましくは-0.5 V

インジェクション電圧：好ましくは-6～-11 V、より好ましくは-6.5～-10.5 V、最も好ましくは-7～-10 V

電流低下率：好ましくは9～15%、より好ましくは9.5～14.5%、最も好ましくは10～14%

穿刺距離：好ましくは18～32 μm 、より好ましくは19～31 μm 、最も好ましくは20～30 μm

インジェクション時間：好ましくは0.5～3.5秒、より好ましくは0.8～3.2秒、最も好ましくは1～3秒

抜去距離：好ましくは40～60 μm 、より好ましくは45～55 μm 、最

も好ましくは $50\ \mu\text{m}$

実施例

[0063] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらにより限定されるものではない。

[0064] (試薬溶液を充填したナノピペットの準備)

ナノピペットを用意した。

ゲノム編集ツール (Cas9-RNP) ($10\text{ ng}/\mu\text{L} \sim 1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$)、蛍光試薬 (種類 FITC 標識 dextran) ($10\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$) を PBS に溶解したゲノム編集ツール試薬溶液を調製した。

試薬溶液を遠心用ホルダに装着したマイクロローダで $3\ \mu\text{L}$ 以上取り、ナノピペットの上部より充填し、卓上遠心器にて $30\text{ sec} \sim 60\text{ sec}$ 遠心した。ナノピペット付属の銀線を、試薬溶液を充填した上部の穴より入れ込み、専用ジグで固定した。この際に、銀線が試薬溶液に浸っていることを確認した。

[0065] (植物サンプルの準備)

表 1 に記載の植物種を用いた。植物の茎頂分裂組織を露出させ、ディッシュなどに並べた。テープなどを使用して、植物個体が動かないように固定した。並べた植物個体全体 (特に茎頂分裂組織) が浸るように電解質溶液を加えた。

[0066] (試薬溶液の植物サンプルの細胞への注入)

植物サンプルを顕微鏡にセットした。試薬溶液を充填したナノピペットを植物細胞への物質導入装置 (YOKOGAWA 製 Single Cell ome™ System UNIT SU10) ヘッド部分に装着し、ロータリーの角度を調節した。SU10 ヘッド付属の参照電極をサンプルの培地中に入れ、SU10 ソフトウェア (measurement モード) をスタートさせた。手動又は Liquid detect モードを使用し、ナノピペットを培地中に接液させ、ソフトウェア上で電流値が 0 nA から上昇したのを確認した。SU10 ジョイスティックなどを操作して、ナノピペットをサ

ンプル中の標的細胞に対応する位置に位置付けした。SU10ソフトウェアをmeasurementモードからdeliveryモードに切り替えた。表1に記載の植物サンプルに応じたパラメータをセッティングした。SU10ソフトウェアでスタートを押し、標的細胞に試薬溶液のデリバリーを行った。次いで、ジョイスティックを操作して次なる標的細胞に対応する位置に位置付けし、次々と細胞へデリバリーを行った。デリバリーが完了したサンプルをピンセットで取り出し、培養用の培地（寒天培地、水を含ませた簡易培地、土壌等）へ移した。その後、植物の培養・生育を開始した。

[0067]

[表1]

植物種	ダイコン (カイワレダイコン) (Raphanus sativus var. hortensis)	オオムギ (Hordeum vulgare)	トマト (Solanum lycopersicum)	トウモロコシ (Zea mays)	ジャガイモ (Solanum tuberosum)
Approach Voltage	Approach Voltage = 1 V	Approach Voltage = 1 V	Approach Voltage = 1 V	Approach Voltage = 1 V	Approach Voltage = 1 V
Injection Voltage	Injection Voltage = 5 V	Injection Voltage = 5 V	Injection Voltage = 5-7 V	Injection Voltage = 5-10 V	Injection Voltage = 5-7 V
Current Drop Rate	Current Drop Rate = 14-20%	Current Drop Rate = 14%	Current Drop Rate = 14%	Current Drop Rate = 14-20%	Current Drop Rate = 20%
Penetration Distance	Penetration Distance = 20-30 μ m	Penetration Distance = 20-30 μ m	Penetration Distance = 20-30 μ m	Penetration Distance = 20-40 μ m	Penetration Distance = 10-30 μ m
Injection Time	Injection Time = 1-3 sec	Injection Time = 1-3 sec	Injection Time = 3 sec	Injection Time = 1-3 sec	Injection Time = 1-3 sec
Retraction Distance	Retraction Distance = 50 μ m	Retraction Distance = 50 μ m	Retraction Distance = 50 μ m	Retraction Distance = 50 μ m	Retraction Distance = 50 μ m

[0068] (イネカルスへのゲノム編集ツール導入試験)

上記と同じ物質導入装置、ナノピペット、顕微鏡等から構成される物質導入システム（以下「SU10システム」という。）を用いてゲノム編集ツール（Cas9/gRNA複合体：RNP）をイネカルスへ導入した。標的遺伝子は、イネPhytoene desaturase遺伝子（OsPDS）とした。この標的遺伝子は、ゲノム編集で破壊されると白色化カルス出現の表現型を呈する。薬剤（ハイグロマイシン）耐性遺伝子の発現カセットを持つプラスミドを共導入し、選抜培養を行って導入カルスのスクリーニングを実施した。

[0069] (供試イネカルスの作製)

イネ（Oryza sativa、品種：日本晴）の種子から、カルス誘導を行った。種子から籾殻を取り除き、70%エタノール及び10%ハイター（登録商標）（花王）溶液を用いて滅菌処理を行った。滅菌した種子は、クリーンベンチ内にて蒸留水で5回以上すすぎ、カルス誘導培地（表2）に移植した。無菌播種した種子は、25℃、暗所の環境でカルス誘導を行った。3週間以上培養したカルスは新規のカルス誘導培地に移植して、2次カルスを増殖した。増殖した2次カルスから活性の高い小さいカルスをピックアップし、寒天培地に埋め込んだ状態で使用した。

[0070] [表2]

イネのカルス誘導培地	
組成	最終濃度
N6無機塩	1
B5V	1x
ショ糖	30 mg/L
2,4-D	2 mg/L
プロリン	3 g
カサミノ酸	1 g
ゲランガム	2 g/L
pH	5.6

[0071] (ゲノム編集ツール (RNP) の調製)

本試験ではイネの *Phytoene desaturase* (OsPDS) 遺伝子をターゲットとしてゲノム編集を行った。ゲノム編集に用いた gRNA の塩基配列 (配列番号 1) を表 3 に示す。gRNA は Guide-it CRISPR/Cas9 Systems (タカラバイオ) を用いて合成した。合成した gRNA は Guide-it Recombinant Cas9 (タカラバイオ) と複合体化してゲノム編集ツール (RNP) を調製し、試験に使用した。複合体化は、1 × PBS バッファー中で 10 分以上室温にてインキュベートすることにより実施した。

[0072] [表3]

RNP合成に使用したgRNA配列	
対象遺伝子	gRNA配列 (括弧内はPAM配列)
OsPDS遺伝子 (イネ)	GTTGGTCITTTGCTCCTGCAG (AGG) (配列番号 1)

[0073] (SU10システムによるゲノム編集ツール (RNP) の導入及び分析)

SU10システムを用いて、固定したイネカルスへのゲノム編集ツール (RNP) インジェクション試験を行った。複合体化した RNP は 0.1 ~ 1 μM 濃度でナノピペットへ充填し SU10システムに設置した。また、選抜マーカーを含むプラスミドを 50 ~ 100 mg/L で同時に導入する区も設けた。固形培地に固定したカルスに対し、30 Shot/カルスとなるように処理を行った。培地表面に張るバッファーは MS 培地を使用し、抗菌剤 (Plant Preservative Mixture (PPM) (Plant Cell Technology 社)) を添加して作業を行った。

[0074] 各 RNP 濃度区あたり、2 ~ 5 カルスに対し、表 4 に記載の条件で SU10システムでデリバリーを行った。処理後のカルスは 35℃ で 1 晩インキュベーションして、ゲノム編集を促進した。その後、通常のカルス誘導条件で培養した。回復培養が完了した後、薬剤 (ハイグロマイシン) 選抜培地へ移行し、サンプリングを行った。サンプリングしたカルスから DNA を抽出し、次世代シーケンシング (NGS) により遺伝子編集の分析を実施した。

[0075] 表4中、インジェクションのパラメータ条件（プロトコル）は、以下のとおりである。

●P r o t e i n用プロトコル

A p p V = 1 V、I n j V = 4 ~ 5 V、C D R = 1 4 %、P e n D = 2 0 μ m、I n j T = 3 ~ 5 s e c、R e t D = 5 0 μ m

●P l a s m i d用プロトコル

A p p V = - 1 V、I n j V = - 4 V、C D R = 1 4 %、P e n D = 2 0 μ m、I n j T = 3 s e c、R e t D = 5 0 μ m

[0076] [表4]

試験No.	Plasmid濃度 (mg/L)	RNP濃度 (μ M)	導入回数	カルス数	導入 プロトコル	選抜 カルス数
1	100		30	2	Plasmid	1
2	100	1	30	2	Protein	1
3		1	30	2	Protein	
4	10		30	5	Plasmid	
5	50		30	5	Plasmid	2
6	100		30	5	Plasmid	1
7	100	0.1	30	5	Protein	1
8	100	0.5	30	5	Protein	2
9	100	1	30	5	Protein	1
10		0.1	30	5	Protein	
11		0.5	30	5	Protein	
12		1	30	5	Protein	
13	10		30	5	Plasmid	
14	50		30	5	Plasmid	1
15	100		30	5	Plasmid	1
16	100	0.1	30	5	Protein	2
17	100	0.5	30	5	Protein	1
18	100	1	30	5	Protein	1
19	100	0.5	100	2	Protein	
20	100	1	100	2	Protein	

[0077] （イネカルスへのゲノム編集ツール導入試験結果）

薬剤（ハイグロマイシン）選抜培地上で薬剤選抜培養を行い、薬剤耐性カルスを、植物細胞へのプラスミドデリバリーに成功したカルスとして取得した（表4の「選抜カルス数」）。DNAフリーのゲノム編集ツール（RNP）の導入により、ターゲット遺伝子PDS変異に起因する一部が白色化した表現型を示すカルスが出現したことを確認した。試験区#17の一部が白色化した表現型を示すカルス（2つのサンプル）の写真を図5に示す。

[0078] また、遺伝子解析（NGS）の結果、DNAフリーのゲノム編集ツール（RNP）の導入によるターゲット遺伝子PDS変異の塩基配列変化を確認した。野生型（配列番号2）に対し約2％の割合で変異（配列番号3）が出現した。なお、理論上の変異部位（Cut site）から少しずれた部位でゲノム編集による配列変化を確認した。再解析の結果も同じ変異を確認し、オフターゲットではあるが確実な変異を確認した。

[化1]

サンプル	配列	Cut Site	PAM配列	リード数
野生型	GGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGGAAATGGGTTGGACGG			（配列番号2） 42203
白色化カルス#17	GGAGTTGGTCTTTGCTCCTGCAGGAAATGGGTTGGACGG			（配列番号3） 964
			変異配列	

[0079] （オオムギの成長点へのゲノム編集ツール導入試験）

SU10システムを用いて、ゲノム編集ツール（Cas9／gRNA複合体：RNP）をオオムギ（*Hordeum vulgare*）種子成長点へ導入した。ターゲット遺伝子はオオムギPhytoene desaturase遺伝子（HvPDS）とした。この標的遺伝子は、ゲノム編集により破壊されると白色化部分出現の表現型を呈する。

[0080] 編集個体のCAPS解析を行うために、HvPDS上のgRNA配列を探索した。HvPDSのエキソン上にgRNA配列（配列番号4、表5）を設計し、このgRNAとCas9タンパク質を複合体化して複合体（RNP）を形成させ、オオムギ成長点へSU10システムで導入した。導入した個体は約2日の回復培養後、セルトレーにて栽培した。

[0081] [表5]

RNP合成に使用したgRNA配列	
対象遺伝子	gRNA配列（括弧内はPAM配列）
HvPDS	GTACGACCTCCCTTGGCTTA(AGG)（配列番号4）

[0082] 各工程は、具体的には以下のように行った。

[0083] 1. gRNA候補の選抜及び配列決定

オオムギデータベースの情報をもとに、HvPDS（LOC123449634）中のgRNAを検索した。候補gRNAはエキソン上にあり、またCas9の切断活性部位（PAM配列から3塩基目）周辺に制限酵素サイトを有する配列8ヶ所を候補とした。また、実際に使用するオオムギ種子中の配列解析よりgRNA候補をさらに絞り込み、Guide-it CRISPR/Cas9 Systems（タカタカラバイオラバイオ）を用い合成し、Cas9タンパクと複合体（RNP）化し、In vitroの切断活性測定を行った。その結果、使用するgRNA配列候補を配列番号4（表5）に決定した。

[0084] 2. 導入RNPの調製・SU10による導入

決定したgRNAと、Cas9タンパク質を混合してRNPを合成した。RNPを濃度1μMで調製した。混合バッファは1×PBSバッファを使用し、10分間以上、室温にてインキュベートすることにより複合体化した。合成したRNPは、1晩給水させたオオムギ種子の成長点を露出させ、SU10システムを用いて成長点の30細胞へ導入を行った。

[0085] 3. 導入オオムギ種子の栽培

RNPを導入した種子はMS培地上で栽培した。栽培後1－2日で根が伸長したため、バクテリアやカビ発生を抑えるために滅菌水を含んだキムタオル（日本製紙クレシア）上へ移植した。翌日、バーミキュライト：育苗培土＝1：1の土を詰めたセルトレーへ移植して栽培した。

[0086] （オオムギの成長点へのゲノム編集ツール導入試験結果）

オオムギ成長点（茎頂分裂組織）へゲノム編集ツール導入後、植物個体ま

で順調に生育成長した茎の中心部が白色化した個体が出現したことを確認した（図6）。この白色化は、ゲノム編集によるPDS遺伝子変異で見られる表現型であった。

[0087] （試薬溶液のオオムギの成長点への注入試験による植物個体への直接注入のための最適パラメータの探索）

ゲノム編集を高効率で行うためのパラメータ確立を目指して、植物個体への直接注入のための最適パラメータを探索した。最適パラメータの探索に当たって、高効率で植物へ試薬溶液をデリバリーでき、かつ導入後の植物の生存率を確保可能であることを最適化の指標とした。

[0088] 対象サンプル：オオムギ（*Hordeum vulgare*）

デリバリー物質：GFP-protein（Abcam社試薬）

デリバリー回数＝1個体10回

N数＝2（ただし、インジェクション電圧5V、時間3～5secはN数＝4）

顕微鏡：実体顕微鏡（Evident社 SZX10）

ナノピペット：NP02（横河電機社製）

[0089] パラメータとして、デリバリー効率に影響を与えると思われるインジェクション電圧とインジェクション時間の組合せについて、最適なパラメータの絞り込みを行った。

[0090] インジェクション電圧が3V～7V、インジェクション時間3sec～5secの条件で、良好な物質導入成功率を確認できた。個体あたりの導入成功率では、インジェクション電圧5Vで印加時間3secの場合最大50%、インジェクション電圧5Vでインジェクション時間5secの場合最大70%と、特に高い値を示したことを確認した。一方、インジェクション電圧は、2V以下、8V以上でデリバリー成功率の低下傾向が確認された。細胞あたりの物質デリバリー量は、インジェクション電圧及びインジェクション時間に依存する可能性が示唆された。デリバリー成功率の結果を表6に示す。導入後の植物の生存率の結果を図7に示す。

[0091] [表6]

	2V	3V	5V	7V	8V	9V
3 sec	10%	10%	35%	7%	7%	10%
5 sec	5%	10%	15%	25%	7%	7%
6 sec	-	15%	20%	10%	10%	5%

(－：データ未取得)

[0092] 対象サンプル：オオムギ (*Hordeum vulgare*)

デリバリー物質：FITCデキストラン

デリバリー回数＝1個体10回

N数＝3

顕微鏡：実体顕微鏡 (Evident社 SZX10)

ナノピペット：NP02 (横河電機社製)

[0093] パラメータとして、デリバリー効率に影響を与えると思われる設定電流低下率について、最適なパラメータの絞り込みを行った。

[0094] 設定電流低下率 (CDR) が3%以上40%以下で良好な物質導入成功率を確認でき、設定電流低下率が5%以上20%でより良好な物質導入成功率を確認できた。デリバリー成功率の結果を表7に示す。物質導入成功率は、オオムギ個体 (各N＝3) の茎頂分裂組織に蛍光試薬 (FITCデキストラン) を10回ずつ導入した総数 (30回) に対し、導入直後に蛍光を観察できた割合としている。物質導入成功率の判定は以下のとおりである。

◎：20%以上

△：10%以上20%未満

×：10%未満

[0095]

[表7]

CDR	50%	45%	40%	35%	20%
判定	×	×	△	△	◎
物質導入成功率	0%	3%	10%	13%	30%以上

CDR	1%	3%	5%
判定	×	◎	◎
物質導入成功率	3%	20%	30%

産業上の利用可能性

[0096] 本開示によれば、ナノピペットを用いた植物細胞へのインジェクション方法において、植物に特化したインジェクション条件を確立し、自動制御された植物細胞へのインジェクションシステムを提供することができる。

符号の説明

- [0097] 1 0 1 ナノピペット
- 1 0 2 ピペット電極
- 1 0 3 三次元（x y z）移動ピペットホルダ
- 1 1 1 植物細胞に導入される物質
- 2 0 1 細胞保持具
- 2 0 2 リファレンス電極
- 2 1 1 植物細胞
- 2 1 2 電解液
- 3 0 1 電流測定回路
- 3 0 2 電圧印加回路
- 4 0 1 光学顕微鏡の観察部
- 4 0 2 光学顕微鏡のステージ
- D 設定穿刺距離
- I イオン電流
- I₀ ベース電流

I_1	定常電流
I_2	設定電流低下率で低下した電流
P_0	電解液表面位置
P_1	電流低下開始点位置
P_2	ピペット一時停止位置
P_3	細胞表面位置
P_4	物質排出位置
R	設定電流低下率
T	時間
T_1	インジェクション時間（印加時間）
V	電圧
V_A	アプローチ用電圧
V_I	インジェクション電圧（印加電圧）

請求の範囲

- [請求項1] 以下を含む、植物細胞への物質導入方法：
- a) 物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程；
 - b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程；
 - c) ナノピペットを1 μm 以上50 μm 以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程；
 - d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程；及び
 - e) ナノピペットを抜去する工程。
- [請求項2] 前記物質が、タンパク質、タンパク質を含む混合物又は複合体、タンパク質及び核酸を含む混合物又は複合体、核酸、又は色素である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記物質が、ゲノム編集用物質である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記物質が、正帯電性物質又は負帯電性物質であり、
- 前記物質が正帯電性物質である場合に、工程d)が、ナノピペットの内部が正電位となり、電解液が負電位となるように電圧を印加することにより行われ、
- 前記物質が負帯電性物質である場合に、工程d)が、ナノピペットの内部が負電位となり、電解液が正電位となるように電圧を印加することにより行われる、
- 請求項2に記載の方法。
- [請求項5] 工程d)が、 -11V 以上 $+11\text{V}$ 以下の設定印加電圧及び0.1秒以上10.0秒以下の設定印加時間で電圧を印加することにより行われる、
- 請求項4に記載の方法。

- [請求項6] 以下を含む、遺伝子改変植物又は植物細胞の製造方法：
- a) 遺伝子改変用物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程；
 - b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程；
 - c) ナノピペットを1 μ m以上50 μ m以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程；
 - d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程；及び
 - e) ナノピペットを抜去する工程。
- [請求項7] 以下を含む方法により製造される、遺伝子改変植物又は植物細胞：
- a) 遺伝子改変用物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程；
 - b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで細胞方向に移動する工程；
 - c) ナノピペットを1 μ m以上50 μ m以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程；
 - d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程；及び
 - e) ナノピペットを抜去する工程。
- [請求項8] 以下を行うための命令を含む、植物細胞への物質導入装置の制御プログラム：
- a) 遺伝子改変用物質を充填したナノピペットを電解液中の植物細胞対応位置に位置付けする工程；
 - b) ナノピペット内部と電解液間の電流を測定しナノピペットを定常電流からの低下率が2%以上50%以下の設定電流低下率の位置まで

細胞方向に移動する工程；

c) ナノピペットを $1\ \mu\text{m}$ 以上 $50\ \mu\text{m}$ 以下の設定穿刺距離で細胞方向に移動して植物細胞に穿刺する工程；

d) ナノピペット内部と電解液間に電圧を印加して物質を植物細胞内に排出する工程；及び

e) ナノピペットを抜去する工程。