

明 細 書

発明の名称：

部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットを含むポリヌクレオチド

技術分野

[0001] 本発明は、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットを含むポリヌクレオチド等に関する。

背景技術

[0002] 植物においては、従来より、伝統的な育種、分子育種、遺伝子組換え等による改良や改変が行われてきた。これにより、例えば、収量、環境適応性、耐病性、耐虫性、生育速度等の植物形質の改良や改変が可能である。

[0003] 近年、部位特異的ヌクレアーゼを使用するゲノム編集技術が、新植物育種技術として注目を浴びている。このような技術の一つとして、CRISPR/Casシステムが知られている。代表的には、Casタンパク質とガイドRNAを導入することにより、様々な動植物において標的遺伝子を変異させることができる。

[0004] ゲノム編集技術においては、その効率の向上が望まれる。特に、複数の遺伝子を同時に変異させようとする場合、効率が低いと、目的の全ての遺伝子に同時に変異を導入することができない。

[0005] 特許文献1には、発現カセットにおいてターミネーター、スキャフォールド／マトリックス結合領域を配置することにより、発現向上させる技術が開示されている。しかしながら、特許文献1には、部位特異的ヌクレアーゼを発現させることについては記載も示唆もされていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：米国特許出願公開第2020／0407741号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ゲノム編集効率がより高い植物ゲノム編集技術を提供すること

を課題とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者は上記課題に鑑みて鋭意研究した結果、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットと核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列とを含むポリヌクレオチドであって、前記部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットが、
- (b) 部位特異的ヌクレアーゼコード配列、並びに (c) ターミネーターを含む3' UTRを含む、ポリヌクレオチド、であれば、上記課題を解決できることを見出した。本発明者は、この知見に基づいてより一層研究を進めた結果、本発明を完成させた。即ち、本発明は、下記の態様を包含する。
- [0009] 項1. 部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットと核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列とを含むポリヌクレオチドであって、前記部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットが、
- (b) 部位特異的ヌクレアーゼ配列、並びに
- (c) ターミネーターを含む3' UTR
- を含む、ポリヌクレオチド。
- [0010] 項2. 前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列がインシュレーターである、項1に記載のポリヌクレオチド。
- [0011] 項3. 前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列が前記3' UTRに含まれる、項1又は2に記載のポリヌクレオチド。
- [0012] 項4. 前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列がスキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターである、項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [0013] 項5. 前記インシュレーターがArsインシュレーター、Gypsyインシュレーター、Bead1インシュレーター、TEFインシュレーター、及びTEF2インシュレーターからなる群より選択される少なくとも1種である、項4に記載のポリヌクレオチド。
- [0014] 項6. 前記インシュレーターがArsインシュレーターである、項5に記載のポリヌクレオチド。

- [0015] 項 7. 前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列がスキャフォールド／マトリックス結合領域である、項 1～3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [0016] 項 8. 前記ターミネーターが少なくとも 2 つのターミネーターの連結体である、項 1～7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [0017] 項 9. 前記 3' UTR 内且つ前記ターミネーターの下流に前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列が配置されている、項 1～8 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [0018] 項 10. 前記ターミネーターが 35S ターミネーター、ACT3 ターミネーター、及びエクステンシンターミネーターからなる群より選択される少なくとも 1 種である、項 1～9 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [0019] 項 11. 前記部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットが、
(a) プロモーター
を含む、項 1～10 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [0020] 項 12. 前記プロモーターが茎頂発現プロモーターである、項 11 に記載のポリヌクレオチド。
- [0021] 項 13. 前記プロモーターが CmYLCV プロモーター、UBQ プロモーター、EF-1 α プロモーター、又は RPS5A プロモーターである、項 11 又は 12 に記載のポリヌクレオチド。
- [0022] 項 14. ウイルスベクター配列を含む、項 1～13 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [0023] 項 15. 前記ウイルスベクター配列がジェミニウイルスベクター配列である、項 14 に記載のポリヌクレオチド。
- [0024] 項 16. 前記ウイルスベクター配列が BeYDV 配列である、項 14 又は 15 に記載のポリヌクレオチド。
- [0025] 項 17. さらに、ガイド RNA 発現カセットを含む、項 1～16 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [0026] 項 18. 項 1～17 のいずれかに記載のポリヌクレオチドからなる、植

物ゲノム編集用ベクター。

- [0027] 項19. 項1～17のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、植物ゲノム編集用キット。
- [0028] 項20. 項1～17のいずれかに記載のポリヌクレオチドを植物に導入することを含む、植物ゲノム編集方法。
- [0029] 項21. さらに、前記ポリヌクレオチドの導入部位に分裂細胞活性化因子を導入することを含む、項20に記載の植物ゲノム編集方法。
- [0030] 項22. 項1～17のいずれかに記載のポリヌクレオチドを植物に導入することを含む、ゲノム編集された植物の製造方法。
- [0031] 項A. 分裂細胞活性化因子発現カセットを含むポリヌクレオチドを含有する、植物ゲノム編集用組成物。
- [0032] 項B. 分裂細胞活性化因子発現カセットを含むポリヌクレオチドを含有する、植物ゲノム編集効率向上化剤。
- [0033] 項C. 部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットと分裂細胞活性化因子発現カセットとを植物に導入することを含む、植物ゲノム編集方法又はゲノム編集された植物の製造方法。
- [0034] 項D. 分裂細胞活性化因子発現カセットを植物に導入することを含む、植物ゲノム編集効率向上化方法。

発明の効果

- [0035] 本発明によれば、ゲノム編集効率がより高い植物ゲノム編集技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0036] [図1]実施例1で作製したCas発現ベクターのベクターマップを示す。矢印はプロモーターを示す。
- [図2]比較例1及び2で作製したCas発現ベクターのベクターマップを示す。矢印はプロモーターを示す。
- [図3]試験例1の結果（ゲノム編集効率）を示す。カラム上方のバーの上端は最大値を示し、カラムの上端は第3四分位を示し、カラム中の横線は中央値を示す。

示し、カラム中の×は平均値を示し、カラムの下端は第1四分位を示し、カラム下方のバーの下端は最小値を示す。灰色の丸は外れ値を示す。

[図4]試験例2-2の結果を示す。(a)はサンガーシーケンス法により得られた標的配列を含むクロマトグラムを、(b)は解析ツール「DECODR」による変異解析の結果を示す。

[図5]試験例2-3の結果を示す。(a)と(b)は異なるガイドRNAの場合の結果を示す。Uncleavedが非切断バンドを示し、WTはCas発現ベクターを導入していない場合を、#33はCas発現ベクターを導入した場合を示す。レーン下方にゲノム編集効率を示す。

[図6]実施例4で作製したCas発現ベクターのベクターマップを示す。矢印はプロモーターを示す。

[図7]比較例4、並びに実施例3及び5～7で作製したCas発現ベクターのベクターマップを示す。矢印はプロモーターを示す。

[図8]試験例3の結果（ゲノム編集効率）を示す。カラム上方のバーの上端は最大値を示し、カラムの上端は第3四分位を示し、カラム中の横線は中央値を示し、カラム中の×は平均値を示し、カラムの下端は第1四分位を示し、カラム下方のバーの下端は最小値を示す。NtEUが比較例4を示し、NtEU_Arsが実施例4を示す。

[図9]試験例4の結果を示す。Uncleavedが非切断バンドを示す。MAD7は実施例8のエフェクター発現ベクターを導入した場合を示し、WTはベクターを導入していない場合を示す。レーン下方にゲノム編集効率を示す。

発明を実施するための形態

[0037] 1. 定義

本明細書中において、「含有」及び「含む」なる表現については、「含有」、「含む」、「実質的にからなる」及び「のみからなる」という概念を含む。

[0038] 本明細書中において、アミノ酸配列の「同一性」とは、2以上の対比可能なアミノ酸配列の、お互いに対するアミノ酸配列の一致の程度をいう。従って

、ある2つのアミノ酸配列の一致性が高いほど、それらの配列の同一性又は類似性は高い。アミノ酸配列の同一性のレベルは、例えば、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて決定される。若しくは、Karlin及びAltschulによるアルゴリズムBLAST (KarlinS, Altschul SF, “Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes” Proc Natl Acad Sci USA, 87:2264–2268 (1990)、KarlinS, Altschul SF, “Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences.” Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873–7 (1993)) を用いて決定できる。このようなBLASTのアルゴリズムに基づいたblastpと呼ばれるプログラムやtblastnと呼ばれるプログラムが開発されている。これらの解析方法の具体的な手法は公知であり、National Center of Biotechnology Information (NCBI) のウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を参照すればよい。また、塩基配列の「同一性」も上記に準じて定義される。

[0039] 本明細書中において、「保存的置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されることを意味する。例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンといった塩基性側鎖を有するアミノ酸残基同士で置換されることが、保存的な置換にあたる。その他、アスパラギン酸、グルタミン酸といった酸性側鎖を有するアミノ酸残基；アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システインといった非帯電性極性側鎖を有するアミノ酸残基；グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンといった非極性側鎖を有するアミノ酸残基；バリン、イソロイシン、ロイシンといった分岐鎖を有するアミノ酸残基；チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンといった芳香族側鎖を有するアミノ酸残基同士での置換も同様に、保存的な置換にあたる。

[0040] 本明細書中において、「コード配列」とは、タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列であり、その限りにおいて特に制限されない。

[0041] 本明細書において、5'側とは、部位特異的ヌクレアーゼコード配列のセンス鎖の5'側を意味し、3'側とは、部位特異的ヌクレアーゼコード配列のセンス鎖の3'側を意味する。5'側を「上流」と示し、また3'側を「下流」と示すこともある。

[0042] 本明細書中において、「植物」は、特に制限されない。植物としては、例えばコケ植物、シダ植物、裸子植物、被子植物のモクレン類、単子葉類、真正双子葉類（バラ類I、バラ類II、キク類I、キク類II及びそれらの外群）を含む広い範囲の植物を挙げることができる。植物のより具体的な例としては、トマト、ピーマン、トウガラシ、ナス、タバコ、トルバム等のナス類；キュウリ、カボチャ、メロン、スイカ等のウリ類；キャベツ、ブロッコリー、ハクサイ等の菜類；セルリー、パセリー、レタス等の生菜・香辛菜類；ネギ、タマネギ、ニンニク等のネギ類；イチゴ、メロン等のその他果菜類；ダイコン、カブ、ニンジン、ゴボウ等の直根類；サトイモ、キャッサバ、ジャガイモ、バレイショ、サツマイモ、ナガイモ等のイモ類；イネ、トウモロコシ、コムギ、ソルガム、オオムギ、ライムギ、ミナトカモジグサ、ソバ等の穀類；ダイズ、アズキ、リョクトウ、ササゲ、インゲンマメ、ラッカセイ、エンドウ、ソラマメ等のマメ類；アスパラガス、ハウレンソウ、ミツバ等の柔菜類；トルコギキョウ、ストック、カーネーション、キク等の花卉類；ベントグラス、コウライシバ等の芝類；ナタネ、ラッカセイ、セイヨウアブラナ、ナンヨウアブラギリ、ゴマ、エゴマ等の油料作物類；ワタ、イグサ等の繊維料作物類；クローバー、デントコーン、タルウマゴヤシ等の飼料作物類；リンゴ、ナシ、ブドウ、モモ等の落葉性果樹類；ウンシュウミカン、オレンジ、レモン、グレープフルーツ等の柑橘類；サツキ、ツツジ、スギ、ポプラ、パラゴムノキ等の木本類等が挙げられる。

[0043] 2. ポリヌクレオチド

本発明は、その一態様として、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットと核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列とを含むポリヌクレオチド

であって、前記部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットが、(b) 部位特異的ヌクレアーゼコード配列、並びに (c) ターミネーターを含む3' UTRを含む、ポリヌクレオチド（本明細書において、「本発明のポリヌクレオチド」と示すこともある。）に関する。以下、これについて説明する。

- [0044] 本発明のポリヌクレオチドは、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットを含む。部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットは、部位特異的ヌクレアーゼを発現する、具体的には部位特異的ヌクレアーゼを産生可能なmRNAを転写するために必要な塩基配列を含む限りにおいて、特に制限されない。
- [0045] 本発明のポリヌクレオチドにおいて、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットは、(b) 部位特異的ヌクレアーゼコード配列を含む。部位特異的ヌクレアーゼコード配列は、部位特異的ヌクレアーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列である限り特に制限されない。
- [0046] 部位特異的ヌクレアーゼとしては、ゲノムDNA上の標的箇所を特異的に切断して、切断断片を生じさせることができるヌクレアーゼである限り特に制限されない。部位特異的ヌクレアーゼとしては、例えば、Casタンパク質、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、またはTAL effector nuclease (TALEN) などが挙げられる。ZFNは、特定の塩基を認識するジンクフィンガーモチーフ数個とDNA切断エフェクタードメインの融合タンパク質である。TALENはTranscription Activator Like (TAL) effectorとDNA切断エフェクタードメインの融合タンパク質である。部位特異的ヌクレアーゼは、他の追加の標的化技術、例えば、メガヌクレアーゼ、またはロイシンジッパーなどで構成される。部位特異的ヌクレアーゼとしては、特にCasタンパク質が好ましい。
- [0047] Casタンパク質は、CRISPR/Casシステムにおいて用いられるものであれば特に制限されず、例えばガイドRNAと複合体を形成した状態でゲノムDNAの標的部位に結合し、該標的部位を切断できるものを各種使用することができる。Casタンパク質としては、各種生物由来のものが知られており、例えば*S. pyogenes*由来のCas9タンパク質 (II型)、*S. solfataricus*由来のCasタンパク質 (I-A型)、*S. solfataricus*由来のCasタンパク質 (I-A型)、*H. walsbyi*由

来のCasタンパク質 (I-B型)、*Microcystis aeruginosa*由来のCasタンパク質 (I-D型)、*E. coli*由来のCasタンパク質 (I-E型)、*E. coli*由来のCasタンパク質 (I-F型)、*P. aeruginosa*由来のCasタンパク質 (I-F型)、*S. thermophilus*由来のCas9タンパク質 (II型)、*S. agalactiae*由来のCas9タンパク質 (II型)、*S. aureus*由来のCas9タンパク質、*N. meningitidis*由来のCas9タンパク質、*T. denticola*由来のCas9タンパク質、*F. novicida*由来のCpf1タンパク質 (V-A型)、*Eubacterium rectale*由来のMAD7タンパク質 (V-A型) 等が挙げられる。これらの中でも、好ましくはCas9タンパク質が挙げられ、より好ましくはストレプトコッカス属に属する細菌が内在的に有するCas9タンパク質が挙げられる。各種Casタンパク質のアミノ酸配列、及びそのコード配列の情報は、NCBI等の各種データベース上で容易に得ることができる。

[0048] Casタンパク質は、野生型の2本鎖切断型Casタンパク質であってもよいし、ニッカーゼ型Casタンパク質であってもよい。2本鎖切断型Casタンパク質は、通常、標的鎖の切断に関与するドメイン (HNHドメイン) 及び非標的鎖の切断に関与するドメイン (RuvCドメイン) を含む。ニッカーゼ型Casタンパク質としては、例えば2本鎖切断型Casタンパク質のこれら2つのドメインの内のいずれかのドメインにおいて、その切断活性を損なわせる (例えば、その切断活性を1/2、1/5、1/10、1/100、1/1000以下にする) 変異を有するタンパク質が挙げられる。このような変異としては、例えば2本鎖切断型Casタンパク質が*S. pyogenes*由来のCas9タンパク質である場合であれば、例えばN末端から10番目のアミノ酸 (アスパラギン酸) のアラニンへの変異 (D10A : RuvCIドメイン内の変異)、N末端から840番目のアミノ酸 (ヒスチジン) のアラニンへの変異 (H840A : HNHドメイン内の変異)、N末端から863番目のアミノ酸 (アスパラギン) のアラニンへの変異 (N863A : HNHドメイン内の変異)、N末端から762番目のアミノ酸 (グルタミン酸) のアラニンへの変異 (E762A : RuvCIIドメイン内の変異)、N末端から986番目のアミノ酸 (アスパラギン酸) のアラニンへの変異 (D986A : RuvCIIIドメイン内の変異) 等が挙げられる。

[0049] Casタンパク質は、その活性を損なわない限りにおいて、アミノ酸配列の変

異（例えば、置換、欠失、挿入、付加等）を有していてもよい。この観点から、Casタンパク質は、野生型2本鎖切断型Casタンパク質、又は該野生型2本鎖切断型Casタンパク質に基づくニッカーゼ型Casタンパク質のアミノ酸配列と、例えば85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つその活性（ガイドRNAと複合体を形成した状態でゲノムDNAの標的部位に結合し、該標的部位を切断する活性）を有するタンパク質であってもよい。或いは、同様の観点から、Casタンパク質は、野生型2本鎖切断型Casタンパク質、又は該野生型2本鎖切断型Casタンパク質に基づくニッカーゼ型Casタンパク質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数個（例えば2～100個、好ましくは2～50個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～10個、よりさらに好ましくは2～5個、特に好ましくは2個）のアミノ酸が置換、欠失、付加、又は挿入（好ましくは保存的置換）されたアミノ酸配列からなり、且つその活性（ガイドRNAと複合体を形成した状態でゲノムDNAの標的部位に結合し、該標的部位を切断する活性）を有するタンパク質であってもよい。なお、上記「活性」は、*in vitro*又は*in vivo*において、公知の方法に従って又は準じて評価することができる。

[0050] 部位特異的ヌクレアーゼは、上記「活性」を有する限りにおいて、公知のタンパク質タグ、シグナル配列、酵素タンパク質等のタンパク質が付加されたものであってもよい。タンパク質タグとしては、例えばビオチン、Hisタグ、FLAGタグ、Haloタグ、MBPタグ、HAタグ、Mycタグ、V5タグ、PAタグ等が挙げられる。シグナル配列としては、例えば核移行シグナル等が挙げられる。酵素タンパク質としては、例えば、各種ヒストン修飾酵素、脱アミノ酵素等が挙げられる。

[0051] 本発明のポリヌクレオチドにおいて、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットは、（c）ターミネーターを含む3' UTRを含む。3' UTRは、部位特異的ヌクレアーゼコード配列の3' 側に配置される。

[0052] ターミネーターは、DNAのmRNAへの転写を終結する塩基配列であり、この限

りにおいて特に制限されない。

- [0053] ターミネーターとしては、好ましくは植物遺伝子又は植物ウイルス由来のターミネーターを採用することができる。ターミネーターは、遺伝子のコード領域の3'側に配置されており、配列解析により容易に同定することができる。ターミネーターとしては、好ましくは35S（好ましくはカリフラワーモザイクウイルスの35S）ターミネーター（具体的には、例えば配列番号4又はその変異配列）、ACT3（好ましくは*Nicotiana benthamiana*のACT3）ターミネーター（具体的には、例えば配列番号5又はその変異配列）、エクステンシン（好ましくは*Nicotiana tabacum*のエクステンシン）ターミネーター（具体的には、例えば配列番号14又はその変異配列）等が挙げられる。
- [0054] ターミネーターは、その機能が著しく低下しない限りにおいて、塩基配列の変異（例えば、置換、欠失、挿入、付加等）を有していてもよい。ターミネーターは、野生型ターミネーターの塩基配列と、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有する。また、ターミネーターは、ターミネーターの機能を強化する改変、例えばエレメントを複数個連結させる改変、特定の配列の塩基長を増やす改変等が行われたものも、包含する。
- [0055] ターミネーターの機能の有無は、対象塩基配列を3' UTRに含む発現カセットからmRNAを発現させ、対象塩基配列がターミネーターとして機能した場合に生成されたmRNA（塩基長で判断可能）が、前記発現カセットから生成された全mRNAの100モル%に対して、例えば50モル%以上、好ましくは70モル%以上、より好ましくは80モル%以上、さらに好ましくは90モル%以上であることを指標として、判断することができる。
- [0056] ターミネーターとして、好ましくは、配列番号4で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むターミネーター、配列番号5で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むターミネーター、配列番号14で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する

塩基配列を含むターミネーター等が挙げられる。

- [0057] ターミネーターは、1つのみであってもよいし、複数であってもよい。本発明の好ましい一態様において、ターミネーターは、少なくとも2つのターミネーターの連結体であることができる。当該連結体において、ターミネーター間は、直接連結されていてもよいし、他の配列を介して間接的に連結されていてもよい。ターミネーターが複数である場合、複数のターミネーターは、同一のターミネーターであってもよいし、互いに異なるターミネーターであってもよい。
- [0058] 本発明のポリヌクレオチドは、核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列を含む。核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列の位置は、本発明のポリヌクレオチド上のいずれであってもよい。核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列は、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセット内に配置されていることが好ましく、当該発現カセットの3' UTRに含まれることがより好ましく、3' UTR内且つターミネーターの下流に配置されていることが特に好ましい。
- [0059] 核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列としては、好ましくはインシュレーターが挙げられる。
- [0060] インシュレーターは、隣接する遺伝子間においても転写調節機構を切り離すことができる塩基配列であり、この限りにおいて特に制限されない。
- [0061] インシュレーターとしては、例えばスキファールド／マトリックス結合領域が挙げられる。スキファールド／マトリックス結合領域は、核マトリックスが付着する領域であり、クロマチンループの形成を誘起することによって、個々の染色体領域の境界を定める機能を含有する。
- [0062] スキファールド／マトリックス結合領域としては、好ましくは植物のスキファールド／マトリックス結合領域を採用することができる。スキファールド／マトリックス結合領域は、公知情報及び配列解析により容易に同定することができる。スキファールド／マトリックス結合領域としては、好ましくはRb7（好ましくは*Nicotiana tabacum*のRb7）スキファールド／マ

トリックス結合領域（具体的には、例えば配列番号6又はその変異配列）が挙げられる。

- [0063] スキャフォールド／マトリックス結合領域は、その機能が著しく低下しない限りにおいて、塩基配列の変異（例えば、置換、欠失、挿入、付加等）を有していてもよい。スキャフォールド／マトリックス結合領域は、野生型スキャフォールド／マトリックス結合領域の塩基配列と、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有する。また、スキャフォールド／マトリックス結合領域は、スキャフォールド／マトリックス結合領域の機能を強化する改変、例えばエレメントを複数個連結させる改変、特定の配列の塩基長を増やす改変等が行われたものも、包含する。
- [0064] スキャフォールド／マトリックス結合領域として、好ましくは、配列番号6で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むスキャフォールド／マトリックス結合領域等が挙げられる。
- [0065] スキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターとしては、例えば核内でクロマチンループドメインを形成し、エンハンサーと標的遺伝子のプロモーターを分離する機能を有するエンハンサー遮断インシュレーター、ヘテロクロマチン形成経路の特定の過程の阻害を行うバリアインシュレーター等が挙げられる。スキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターは、公知情報及び配列解析により容易に同定することができる。スキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターとしては、*Drosophila*のGypsyインシュレーター（配列番号15又はその変異配列）、HumanのBead1 (blocking element alpha/delta-1 of the human T-cell receptor α/δ locus) インシュレーター（配列番号16又はその変異配列）、Sea urchinのArs (arylsulfatase) インシュレーター（配列番号17又はその変異配列）、*A. gossypii*のTEF (translation elongation factor) インシュレーター（配列番号18又はその変異配列）、及びYeastのTEF2 (translat

ion elongation factor 2) インシュレーター（配列番号19又はその変異配列）が好ましい。これらの中でも、ゲノム編集効率をより顕著に大きく向上させるという観点から、Arsインシュレーターがとりわけ好ましい。

[0066] スキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターは、その機能が著しく低下しない限りにおいて、塩基配列の変異（例えば、置換、欠失、挿入、付加等）を有していてもよい。スキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターは、スキャフォールド／マトリックス結合領域以外の野生型のインシュレーターの塩基配列と、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有する。また、スキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターは、その機能を強化する改変、例えばエレメントを複数個連結させる改変、特定の配列の塩基長を増やす改変等が行われたものも、包含する。

[0067] スキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターとして、好ましくは、配列番号15で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むインシュレーター、配列番号16で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むインシュレーター、配列番号17で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むインシュレーター、配列番号18で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むインシュレーター、配列番号19で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むインシュレーター等が挙げられる。これらの中でも、ゲノム編集効率をより顕著に大きく向上させるという観点から、配列番号17で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むインシュレーターがとりわけ好ましい。

[0068] 本発明の好ましい一態様においては、ターミネーターの下流（3'側）に核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列が配置されている。

[0069] 本発明のポリヌクレオチドにおいて、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットは、（a）プロモーターを含むことが好ましい。プロモーターは、部位特異

的ヌクレアーゼコード配列の5'に配置される。

[0070] プロモーターは、遺伝子転写の開始、促進に関与する遺伝子上流領域であり、この限りにおいて特に制限されない。プロモーターは、通常、転写開始点、その上流（5'側）の配列、及び必要に応じてその下流（3'側）の配列を含む。プロモーターとしては、遺伝子の転写開始点の塩基を+1、その下流（3'側）が正の値、その上流（5'側）が0又は負の値とした場合、例えば-10000～+500、好ましくは-5000～+200、より好ましくは-2000～+150のDNA領域内の、転写開始点を含む任意のDNA領域が挙げられる。なお、転写開始点が複数存在する場合は、最も転写量の多い転写開始点を選択することができる。プロモーターの長さ（塩基対数：bp）は、例えば100～10000 bp、好ましくは200～5000 bp、より好ましくは500～3000 bpの範囲の長さが挙げられる。

[0071] プロモーターとしては、好ましくは植物遺伝子又は植物ウイルス由来のプロモーターを採用することができる。プロモーターは、遺伝子のコード領域の5'側に配置されており、配列解析により容易に同定することができる。プロモーターとしては、好ましくはCmYLCVプロモーター（具体的には、例えば配列番号20（＝配列番号1）又はその変異配列）、UBQプロモーター（具体的には、例えばレタスユビキチンプロモーター（配列番号21又はその変異配列）、ダイズユビキチンプロモーター（配列番号22又はその変異配列）、キクユビキチンプロモーター（配列番号23、24、25又はその変異配列）、パセリユビキチンプロモーター（配列番号26又はその変異配列）、エゴマユビキチンプロモーター（配列番号27又はその変異配列））、EF-1 α （好ましくは*Nicotiana benthamiana*のEF-1 α ）プロモーター（具体的には、例えば配列番号28又はその変異配列）、RPS5A（好ましくは*Arabidopsis thaliana*のRPS5A）プロモーター（具体的には、例えば配列番号29又はその変異配列）等が挙げられる。

[0072] プロモーターは、その機能が著しく低下しない限りにおいて、塩基配列の変異（例えば、置換、欠失、挿入、付加等）を有していてもよい。プロモ-

ターは、野生型プロモーターの塩基配列と、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有する。また、プロモーターは、プロモーターの機能を強化する改変、例えばエレメントを複数個連結させる改変、特定の配列の塩基長を増やす改変等が行われたものも、包含する。

[0073] プロモーターとして、好ましくは、配列番号20（＝配列番号1）で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むプロモーター、配列番号21～27で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むプロモーター、配列番号28で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むプロモーター、配列番号29で示される塩基配列に対して70%以上の同一性を有する塩基配列を含むプロモーター等が挙げられる。

[0074] 本発明の一態様において、プロモーターは、茎頂発現プロモーターであることが好ましい。茎頂発現プロモーターは、茎頂の細胞において発現可能なプロモーターであり、その限りにおいて特に制限されない。

[0075] 本発明のポリヌクレオチドは、ウイルスベクター配列を含むことが好ましい。ウイルスベクター配列は、ウイルス複製に関与する配列を含むものである限り、特に制限されない。

[0076] ウイルスベクター配列の由来ウイルスとしては、特に好ましくはジェミニウイルスが挙げられる。ジェミニウイルスは、ローリングサークル型DNA複製機構を有するものであれば特に限定されず、例えば、ジェミニウイルス科マストレウイルス属のインゲン黄斑萎縮ウイルス（BeYDV）、トウモロコシ条斑ウイルス（MSV）、小麦矮化ウイルス（WDV）、タバコ黄萎ウイルス（TYDV）、ヒヨコマメ退緑黄化病矮性ウイルス（CpCDV）、ジェミニウイルス科ベゴモウイルス属のトマトゴールデンモザイクウイルス（TGMV）、アフリカキヤッサバモザイクウイルス（ACMV）、キャベツ葉巻ウイルス（CaLCuV）、Tomato leaf curl virus（ToLCV）、カッコウアザミ葉脈黄化ウイルス（AYVV）

、ジェミニウイルス科クルトウイルス属のBeet severe curly top virus (BC TV) 等が挙げられる。

[0077] また、上記以外にも、各種植物ウイルス、例えばタバコモザイクウイルス、キュウリモザイクウイルス、リンゴ小球形潜在ウイルス、オオムギ斑葉モザイクウイルス、Bean pod mottle virus、Beet curly top virus、Brome mosaic virus、Cabbage leaf curl virus、Cotton leaf crumple virus、シンビジュームモザイクウイルス、ブドウAウイルス、Pea early browning virus、Poplar mosaic virus、ジャガイモXウイルス、Rice tungro bacilliform virus、サテライトタバコモザイクウイルス、Tobacco curly shoot virus、タバコ茎えそウイルス等の植物ウイルス由来のウイルスベクター配列を採用することもできる。

[0078] 部位特異的ヌクレアーゼがCasタンパク質である場合、本発明のポリヌクレオチドは、さらにガイドRNA発現カセットを含むことが好ましい。Casタンパク質発現カセットとガイドRNA発現カセットが同一分子（ポリヌクレオチド）内に存在していることによって、Casタンパク質とガイドRNAとを効率的に同一細胞内で発現させることができ、ひいてはゲノム編集効率をより高めることが可能である。

[0079] ガイドRNA発現カセットはガイドRNAコード配列を含む。

[0080] ガイドRNAコード配列は、ガイドRNAをコードする塩基配列である限り特に制限されない。

[0081] ガイドRNAは、CRISPR/Casシステムにおいて用いられるものであれば特に制限されず、例えばゲノムDNAの標的部位に結合し、且つCasタンパク質と結合することにより、Casタンパク質をゲノムDNAの標的部位に誘導可能なものを各種使用することができる。

[0082] 本明細書において、標的部位とは、PAM (Protospacer Adjacent Motif) 配列及びその5'側あるいは3'側に隣接する17～30塩基長（好ましくは18～25塩基長、より好ましくは19～22塩基長、特に好ましくは20塩基長）程度の配列からなるDNA鎖（非標的鎖）とその相補DNA鎖（標的鎖）からなる、ゲノムD

NA上の部位である。

[0083] PAM配列は、利用するCasタンパク質の種類によって異なる。例えば、*S. pyogenes*由来のCas9タンパク質（II型）に対応するPAM配列は5′-NGGであり、*S. solfataricus*由来のCasタンパク質（I-A型）に対応するPAM配列は5′-CCN／5′-TCNであり、*H. walsbyi*由来のCasタンパク質（I-B型）に対応するPAM配列は5′-TTCであり、*E. coli*由来のCasタンパク質（I-E型）に対応するPAM配列は5′-ARGであり、*E. coli*由来のCasタンパク質（I-F型）に対応するPAM配列は5′-CCであり、*P. aeruginosa*由来のCasタンパク質（I-F型）に対応するPAM配列は5′-CCであり、*S. thermophilus*由来のCas9タンパク質（II型）に対応するPAM配列は5′-NNAGAAであり、*S. agalactiae*由来のCas9タンパク質（II型）に対応するPAM配列は5′-NGGであり、*S. aureus*由来のCas9タンパク質に対応するPAM配列は、5′-NNGRRTであり、*N. meningitidis*由来のCas9タンパク質に対応するPAM配列は、5′-NNNNGATTであり、*T. denticola*由来のCas9タンパク質に対応するPAM配列は、5′-NAAAACである。なお、上記PAM配列において、Nは任意の塩基を示す。

[0084] ガイドRNAはゲノムDNAの標的部位への結合に関与する配列（crRNA（CRISPR RNA）配列といわれることもある）を有しており、このcrRNA配列が、標的鎖のPAM配列の相補配列を除いてなる配列に相補的（好ましくは、相補的且つ特異的）に結合することにより、ガイドRNAはゲノムDNAの標的部位に結合することができる。

[0085] なお、「相補的」に結合とは、完全な相補関係（AとT、及びGとC）に基づいて結合する場合のみならず、ストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補関係に基づいて結合する場合も包含される。ストリンジェントな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の条件を挙げることで

きる。かかる条件で洗浄してもハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件として「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の洗浄条件を挙げることができる。

[0086] 具体的には、crRNA配列の内、標的配列に結合する配列は、非標的鎖と例えば90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、特に好ましくは100%の同一性を有する。

[0087] ガイドRNAに関して、Casタンパク質との結合に関与する配列（tracrRNA（trans-activating crRNA）配列といわれることもある）を有している場合、このtracrRNA配列が、Casタンパク質に結合することにより、Casタンパク質をゲノムDNAの標的部位に誘導することができる。

[0088] tracrRNA配列は、特に制限されない。tracrRNA配列は、典型的には、複数（通常、3つ）のステムループを形成可能な50～100塩基長程度の配列からなるRNAであり、利用するCasタンパク質の種類に応じてその配列は異なる。tracrRNA配列としては、利用するCasタンパク質の種類に応じて、公知の配列を各種採用することができる。

[0089] ガイドRNAは、通常、上記したcrRNA配列とtracrRNA配列を含む。ガイドRNAの態様は、crRNA配列とtracrRNA配列を含む一本鎖RNA（sgRNA）であってもよいし、crRNA配列を含むRNAとtracrRNA配列を含むRNAとが相補的に結合してなるRNA複合体であってもよい。

[0090] 本発明のポリヌクレオチドは、上記以外の他の塩基配列を含むことができる。他の塩基配列としては、例えば薬剤耐性遺伝子、レポータータンパク質コード配列、これらの発現カセット； タンパク質タグコード配列； シグナル配列コード配列； 複製起点； アグロバクテリウム法で使用されるバイナリーベクターの各エレメント配列（例えば左境界領域、右境界領域等）等が挙げられる。

[0091] 薬剤耐性遺伝子としては、例えばクロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性

遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

[0092] レポータータンパク質としては、特に制限されず、例えば特定の基質と反応して発光（発色）する発光（発色）タンパク質、或いは励起光によって蛍光を発する蛍光タンパク質等が挙げられる。発光（発色）タンパク質としては、例えばルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 β グルクロニダーゼ等が挙げられ、蛍光タンパク質としては、例えばGFP、Azami-Green、ZsGreen、GFP2、HyPer、Sirius、BFP、CFP、Turquoise、Cyan、TFP1、YFP、Venus、ZsYellow、Banana、KusabiraOrange、RFP、DsRed、AsRed、Strawberry、Jred、KillerRed、Cherry、HcRed、mPlum等が挙げられる。また、レポータータンパク質には、発光（発色）タンパク質や蛍光タンパク質と、他のタンパク質（例えば種子特異的タンパク質）との融合タンパク質や、発光（発色）タンパク質や蛍光タンパク質に公知のタンパク質タグ、公知のシグナル配列等が付加されてなるタンパク質も包含される。

[0093] タンパク質タグとしては、例えばビオチン、Hisタグ、FLAGタグ、Haloタグ、MBPタグ、HAタグ、Mycタグ、V5タグ、PAタグ等が挙げられる。

[0094] 本発明のポリヌクレオチドは、1本鎖であってもよいし、2本鎖であってもよい。また、線状であっても、環状であってもよい。さらに、本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNAのみならず、これらに、次に例示するように、公知の化学修飾が施されたものも包含する。ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各リボヌクレオチドの糖（リボース）の2位の水酸基を、 $-OR$ （ R は、例えば CH_3 （2'-O-Me）、 $CH_2CH_2OCH_3$ （2'-O-MOE）、 $CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $CH_2CONHCH_3$ 、 CH_2CH_2CN 等を示す）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン

性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。さらには、リン酸部分やヒドロキシル部分が、例えば、ビオチン、アミノ基、低級アルキルアミン基、アセチル基等で修飾されたものなどを挙げることができるが、これに限定されない。また、「ポリヌクレオチド」の語は、天然の核酸だけでなく、BNA (Bridged Nucleic Acid)、LNA (Locked Nucleic Acid)、PNA (Peptide Nucleic Acid) 等の何れも包含する。

[0095] 本発明のポリヌクレオチドは、その一態様においては、1本鎖ポリヌクレオチド（例えばRNA）である。本発明のポリヌクレオチドは、別の一態様においては、2本鎖ポリヌクレオチド（例えばバイナリーベクター等のベクター等）である。

[0096] 本発明のポリヌクレオチドは、ベクターを構成していてもよい。ベクターの種類としては、特に制限されず、例えばプラスミドベクター；アグロバクテリウムベクター；植物ウイルスベクター等が挙げられる。また、上記のベクターのように、植物又は植物細胞への導入に適したベクター以外にも、このようなベクターに本発明のポリヌクレオチドを移し替えるためのベクター（例えば、ゲートウェイ（登録商標）のエントリークローンベクター等）も一例として挙げることができる。本発明は、その一態様において、本発明のポリヌクレオチドからなる、ベクター（好ましくは、植物ゲノム編集用ベクター）、に関する。

[0097] 本発明のポリヌクレオチドは、公知の遺伝子工学的手法に従って容易に作製することができる。例えば、PCR、制限酵素切断、DNA連結技術、in vitro 転写技術等を利用して作製することができる。また、市販の植物ウイルスの各種ベクター（バイナリーベクター等）を基に、必要な配列（例えば、部位特異的ヌクレアーゼコード配列等）を組み込むことによって、簡便に作製することができる。

[0098] 3. 植物ゲノム編集用組成物、植物ゲノム編集用キット、植物ゲノム編集方法、植物製造方法

本発明のポリヌクレオチドは、植物ゲノム編集用組成物として利用するこ

ともできるし、或いは植物ゲノム編集用キットとして利用することもできる。また、本発明のポリヌクレオチドを利用する、植物ゲノム編集方法、ゲノム編集された植物の製造方法を提供することができる。

[0099] 植物ゲノム編集用組成物は、本発明のポリヌクレオチドを含有する限りにおいて特に制限されず、必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。他の成分としては、特に限定されるものではないが、例えば基剤、担体、溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、増粘剤、保湿剤、着色料、香料、キレート剤等が挙げられる。植物ゲノム編集用組成物は、必要に応じて、ガイドRNA発現カセットを含むポリヌクレオチドを含んでもよい。また、必要に応じて、ドナーポリヌクレオチドを含んでもよい。

[0100] 植物ゲノム編集用キットは、本発明のポリヌクレオチドが含まれている限りにおいて特に制限されず、必要に応じて核酸導入試薬、緩衝液等、本発明の植物ゲノム編集方法の実施に必要な他の材料、試薬、器具等を適宜含んでもよい。本発明の植物ゲノム編集方法の実施に必要な他の材料としては、植物ゲノム編集用キットは、必要に応じて、ガイドRNA発現カセットを含むポリヌクレオチドを含んでもよい。また、必要に応じて、ドナーポリヌクレオチドを含んでもよい。

[0101] 植物ゲノム編集方法、植物の製造方法は、本発明のポリヌクレオチドを植物に導入することを含む。

[0102] また、植物ゲノム編集方法、植物の製造方法は、本発明のポリヌクレオチドの導入部位に分裂細胞活性化因子を導入する、又は本発明のポリヌクレオチドの導入部位における内在分裂細胞活性化因子の発現を制御することを含むことが好ましい。当該分裂細胞活性化因子は、本発明のポリヌクレオチドの導入部位の細胞の増殖を促進、導入組織の成長を促進または導入部位の細胞の分裂面を変化させることができるものである限り、特に制限されない。導入部位が茎頂である場合、分裂細胞活性化因子の内、細胞の増殖を促進、導入組織の成長を促進できるものとしては、例えばWUSCHEL-Related Homeobo

x 転写因子（好ましくはZea maysのWUS2、以下ZmWUS2）（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号11又はその変異配列）、isopentenyl transferase (ipt)（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号13又はその変異配列）、NAC転写因子（例えばArabidopsis thalianaのCUC1）（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号30又はその変異配列）、N末端のsignal receiver domainを欠失したResponse Regulator（例えばArabidopsis thalianaのN末端にあるDDK signal receiver domainを欠失させたARR1）（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号31又はその変異配列）、Cyclin（例えばArabidopsis thalianaのCycD2;1）（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号32又はその変異配列）、Negative regulation domainを欠失したMYB3R転写因子（例えばNicotiana tabacumの631-1042番目のアミノ酸を欠失させたmyb A2）（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号33又はその変異配列）、E2F（例えばArabidopsis thalianaのE2F3）（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号34又はその変異配列）、DP（例えばArabidopsis thalianaのDPa）（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号35又はその変異配列）、bHLH転写因子（例えばArabidopsis thalianaのHEC1）（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号36又はその変異配列）が挙げられ、導入部位の細胞の分裂面を変化することができるものとしては、例えば、プロテインホスファターゼ2抑制因子（例えばArabidopsis thalianaのPP2AC1-5の抑制因子（例えば、当該タンパク質の機能をドミナントに阻害するポリペプチド、具体的には、例えば配列番号37～41又はその変異配列））、TONNEAU 2抑制因子（例えばSolanum lycopersicumのTON2（アミノ酸配列は、具体的には、例えば配列番号42又はその変異配列）の抑制因子（例えば、当該タンパク質を標的として発現抑制するRNAiベクター））が挙げられ、さらにはそれぞれの組み合わせが挙げられる。これらの中でも、ゲノム編集効率をより顕著に大きく向上させるという観点から、WUSCHEL-Related Homeobox 転写因子（好ましくはZmWUS2）とiptとの組合せ、NAC転写因子（例えばArabidopsis thalianaのCUC1）、Cyclin（例えばArabidopsis thalianaのCycD2;1）、E2F（例え

ば*Arabidopsis thaliana*のE2F3)とDP(例えば*Arabidopsis thaliana*のDPa)との組合せが好ましく、中でもWUSCHEL-Related Homeobox 転写因子(好ましくはZmWUS2)とiptとの組合せ、Cyclin(例えば*Arabidopsis thaliana*のCycD2;1)、E2F(例えば*Arabidopsis thaliana*のE2F3)とDP(例えば*Arabidopsis thaliana*のDPa)との組合せがより好ましく、WUSCHEL-Related Homeobox 転写因子(好ましくはZmWUS2)とiptとの組合せがとりわけ好ましい。

[0103] 分裂細胞活性化因子発現カセットは、コード配列を発現可能な状態または標的タンパク質の機能抑制が可能な状態で含むものであり、この限りにおいて特に制限されない。

[0104] 分裂細胞活性化因子及び分裂細胞活性化因子が標的とする因子は、その機能が著しく低下しない限りにおいて、アミノ酸配列の変異(例えば、置換、欠失、挿入、付加等)を有していてもよい。分裂細胞活性化因子またはその標的因子のアミノ酸配列は、野生型アミノ酸配列と、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、よりさらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有する。

[0105] 分裂細胞活性化因子発現カセットは、好ましくはプロモーター、ターミネーター等を含む。本発明の一態様において、これらの発現カセットは、本発明のポリヌクレオチドの部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットと同様の構成を備えることができる。これらの発現カセットは、本発明のポリヌクレオチド内に組込まれていてもよいし、本発明のポリヌクレオチドとは別分子であるポリヌクレオチドに組込まれていてもよい。

[0106] 上記分裂細胞活性化因子とCRISPR/Casシステムにおいて併用することにより、ゲノム編集効率を向上させることができる。この観点から、本発明は、その一態様において、部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットと分裂細胞活性化因子発現カセットとを植物に導入することを含む、植物ゲノム編集方法又はゲノム編集された植物の製造方法、に関する。また、本発明は、その一態様において、分裂細胞活性化因子発現カセットを含むポリヌクレオチドを含有する、植物ゲノム編集用組成物、植物ゲノム編集効率向上化剤等、に関する。

る。これらの組成物、剤の構成については、本発明のポリヌクレオチドを含む植物ゲノム編集用組成物の構成を援用することができる。

- [0107] 本発明のポリヌクレオチド、分裂細胞活性化因子の植物への導入方法は、特に制限されず、公知の方法に従って又は準じて行うことができる。
- [0108] 植物における導入部位としては、例えば茎頂、花（特に、花の中の、卵細胞、花粉等）、葉、根等が挙げられる。
- [0109] 導入方法は、特に制限されず、導入する物の種類や導入対象に応じて、適宜選択することができる。導入方法としては、例えばフローラル・ディップ法、フローラル・スプレー法等のアグロバクテリウム法； パーティクル・ガン法； ウイルス媒介性核酸送達等が挙げられる。これらの中でも、簡便性や安全性等の観点から、好ましくはパーティクル・ガン法が挙げられる。
- [0110] 導入方法のより具体的な例を以下に示す。
- [0111] 導入方法の1つ目の例（導入例1）としては、プロモーター（例えばT7プロモーター、T3プロモーター、35Sプロモーター等）、及びその下流に本発明のポリヌクレオチドの配列を含むプラスミドを準備する工程（工程a1）を含む方法によって行うことができる。工程a1で得られたプラスミドが35Sプロモーター等の植物細胞内で転写活性化能を持つプロモーターを含むTiプラスミドである場合であれば、工程a1で得られたプラスミドをアグロバクテリウムに導入して培養する工程（工程b1）、及び工程b1で得られた培養液を植物に接種（例えば、インフィルトレーション法、爪楊枝接種法、吸引注入法等）する工程（工程c1）を含む方法によって行うことができる。或いは、上記工程b1及びc1に代えて、例えば工程a1で得られたプラスミドを植物に接種（例えば磨砕接種法、パーティクル・ガン法等）する工程（工程c2）を含む方法によって行うことができる。或いは、上記工程c1に代えて、例えばリーフディスク法や花序浸潤法、減圧濾過法等を行う工程（工程c3）を含む方法によって行うことができる。これらの方法により植物内に導入されたプラスミドやT-DNAから、目的のタンパク質が産生される。
- [0112] パーティクル・ガン法では、目的遺伝子を標的とするヌクレアーゼ遺伝子

や細胞活性化因子をコードする核酸およびタンパクを微粒子の表面に被覆して標的細胞に打ち込むことができる。微粒子としては、細胞内への貫通力を高めるため、高比重で、かつ、化学的に不活性であり生体に害を及ぼしにくいという理由から金属微粒子が好ましく用いられる。金属微粒子の中でも、金粒子、タングステン粒子などが特に好ましく用いられる。

- [0113] パーティクル・ガン法では以下のようにして目的遺伝子を植物細胞に導入することができる。まず、金粒子またはタングステン粒子などの微粒子を洗浄滅菌し、該微粒子、核酸（組換えベクター、直鎖状DNA、RNAなど）またはタンパク質、 CaCl_2 、スぺルミジンをボルテックスミキサーなどで攪拌しながら加えて、DNA・RNA、タンパク質を金粒子またはタングステン粒子にコーティングし、エタノールまたはリン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。
- [0114] 前記微粒子の粒径（直径）は、標的細胞の種類や微粒子の種類、ガス圧などに応じて、適宜最適な値を決定することができる。
- [0115] 金粒子またはタングステン粒子は、ピペットマンなどを用いてマクロキャリアフィルムに可能な限り均一に塗布した後、クリーンベンチなどの無菌環境中で乾燥させる。そして、マクロキャリアフィルム、標的細胞を置床したプレートをパーティクルガン装置に設置し、ガス加速管から高圧ヘリウムガスをマクロキャリアフィルムに向かって発射する。マクロキャリアフィルムはストップピングプレートで止まるが、粒子はストップピングプレートを通して、ストップピングプレートの下に設置した標的細胞に貫入し、目的遺伝子が導入される。
- [0116] ストップピングプレートと標的細胞との距離は、標的細胞の種類、微粒子の種類、粒径、ガス圧などに応じて、適宜最適な値を決定することができる。
- [0117] ガス圧としては、標的細胞の種類、微粒子の種類、ターゲットとストップピングプレートとの距離などに応じて、適宜最適な圧力を決定することができる。
- [0118] 微粒子を撃ち込まれた細胞中では、核酸および/またはタンパク質が微粒子

から遊離する。核酸の場合、核への移行後に発現が開始され、翻訳されたヌクレアーゼが核に移行してゲノムDNAを切断する。その後、その修復の過程で変異が起こりゲノム編集された細胞が得られる。タンパク質の場合は、核移行シグナル（オルガネラ移行シグナルであってもよい）により核（オルガネラ）に移行し、DNAを切断することにより、ゲノム編集が起こる。ゲノム編集は核のゲノム遺伝子のみでなく、オルガネラ（葉緑体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官）の遺伝子についても適用可能である。この場合は、各オルガネラへの移行シグナルをヌクレアーゼに連結させて導入してもよく、ヌクレアーゼなどに連結するプロモーターを各オルガネラでのみ発現するプロモーターを用いてもよい。

- [0119] 導入後は、植物を一定時間培養することにより、植物内で部位特異的ヌクレアーゼが発現し、ゲノム編集が起こる。培養期間は、例えば1～30日間である。
- [0120] 培養の態様は特に制限されない。例えば、植物が生育環境で生育している植物体又はその一部である場合は、そのまま生育を継続すればよい。また、植物が、生育環境から分離した植物体又はその一部である場合や、植物体から分離されたものである場合は、対象物を適切な環境下（例えば、保湿環境下や一定温度を保つ環境下）に置いて培養する。
- [0121] ゲノム編集の有無の確認は、対象物から得られた核酸を使用して、公知の方法に従って、例えばT7 Endonuclease I assay、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 解析、ゲノム編集対象部位周辺（部位特異的ヌクレアーゼの切断部位周辺）の塩基配列の変異を検出する方法（例えば変異予想位置に設計したプライマーを用いる方法、シーケンス解析等）等によって行うことができる。
- [0122] 本発明の植物ゲノム編集方法により、ゲノム編集された植物を製造することができる。
- [0123] また、本発明のゲノム編集技術によれば、ゲノム編集された生殖細胞を取得することも期待できる。該生殖細胞から次世代植物を得ることにより、全

細胞がゲノム編集された植物を得ることができる。

実施例

[0124] 以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0125] 実施例1. Cas発現ベクターの作製1

ジェミニウイルスベクター (bean yellow dwarf virus (BeYDV)) の配列を含むpTTK352バイナリーベクターに、Casタンパク質発現カセット、及びガイドRNA発現カセットを挿入して、Cas発現ベクター (図1) を得た。

[0126] Cas発現ベクターは次のようにして作製した。既報 (Tsutsui et al. (2016) pKAMA-ITACHI Vectors for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout in Arabidopsis thaliana, Plant and Cell Physiology, Vol.58 (Issue 1), pp.46-56) に記載のpKIRベクター (バイナリー) のLeft BorderとRight Borderの間に人工合成したBeYDV由来の配列をシームレスクローニング法により挿入した。BeYDV由来のMPとCPは削除しており、Replicase proteinsをコードする配列、long intergenic region (LIR) 及びsmall intergenic region (SIR) を利用した。

[0127] 挿入したCasタンパク質発現カセットは、5'末端側から順に、

- (1) Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) プロモーター (配列番号1)、
 - (2) dMac3配列 (配列番号2) 又はNtADH 5' UTR配列 (配列番号66)
 - (3) エピトープタグ及び核移行シグナルを付加した形式のStreptococcus pyogenes由来Cas9 (SpCas9) タンパク質コード配列 (配列番号3)、
 - (4) カリフラワーモザイクウイルスの35Sターミネーター (配列番号4)、
 - (5) Nicotiana benthamianaのACT3 (ACTIN3) (NbACT3) ターミネーター (配列番号5)、
 - (6) Nicotiana tabacumのRb7 スキャフォールド／マトリックス結合領域 (MAR) (配列番号6)、
- が配置されてなるDNAである。

- [0128] 挿入したガイドRNA発現カセットは、5′末端側から順に、
(7) *Arabidopsis thaliana*のU6-26プロモーター（配列番号7）、
(8) *Nicotiana benthamiana*のphytoene desaturase (NbPDS) 遺伝子内の配列を標的とするsgRNA配列及びポリT配列（配列番号8）、
が配置されてなるDNAである。
- [0129] 挿入方法は次のとおりである。Lampropoulosら（2013）の方法を一部改変したGolden Gate法を用いた。上記1~8の配列を入れたカセットをNEB Golden Gate Assembly Kitを用いてGolden Gate反応を行い、BeYDV由来のLIR配列とSIR配列の間に組み上げることで挿入した。反応条件は上記キットの推奨プロトコルに準じて行った。各カセット間の連結用の塩基配列（4塩基）として、上記1の配列を入れたカセットの直上にACCT、上記1の配列を入れたカセットと上記2の配列を入れたカセットの間にAACA、上記2の配列を入れたカセットと上記3の配列を入れたカセットの間にGGCT、上記4~6の配列を入れたカセットと上記7~8の配列を入れたカセットの間にACTA、上記7~8の配列を入れたカセットの直下にGTATを挿入した。また、上記3の配列を入れたカセットと上記4~6の配列を入れたカセットの間には連結用の塩基配列としてTCAG+46塩基+CTGCを挿入した。
- [0130] 比較例1. Cas発現ベクターの作製2
Casタンパク質発現カセットとして、(4)、(5)、及び(6)に代えて、
(4′) NOSターミネーター（配列番号9）、
が組み込まれたCasタンパク質発現カセットを挿入する以外は実施例1と同様に
してCas発現ベクター（図2）を得た。
- [0131] 比較例2. Cas発現ベクターの作製3
Casタンパク質発現カセットとして、(4)、(5)、及び(6)に代えて、
(4″) *Arabidopsis thaliana*のUBQターミネーター（配列番号43）、
が組み込まれたCasタンパク質発現カセットを挿入する以外は実施例1と同様に
してCas発現ベクター（図2）を得た。
- [0132] 試験例1. ゲノム編集試験1

実施例1のCas発現ベクター、比較例1及び比較例2のCas発現ベクターそれぞれを用いてゲノム編集を行い、ゲノム編集効率を比較した。具体的には以下のようにして行った。

[0133] <アグロバクテリウムの準備>

実施例1のCas発現ベクター、比較例1及び比較例2のCas発現ベクターをエレクトロポレーション法により*Rhizobium radiobacter* strain GV3101に導入し、抗生物質を含むLBプレートに撒いて28℃で3日間培養した。抗生物質を含むLB液体培地3mLでシングルコロニーを一晩前培養(28℃, 180rpm)し、LB液体培地7mLを加えて2時間培養後(28℃, 180rpm)、集菌した。Induction buffer (10mM MES, 100μM Acetosyringone, pH5.5 with NaOH)に再懸濁し、2-3時間誘導を行った。Infiltration buffer (5mM MES, pH5.5 with NaOH) に再懸濁後、各アグロ菌液をOD=0.7となるように調整し、接種用菌液とした。

[0134] <タバコ葉へのインフィルトレーション>

使用する*Nicotiana benthamiana*は、種子をハイター滅菌後、播種培地に広げ、4℃暗所に4日間静置後に25℃、16時間明期8時間暗期サイクル (16L8D)のチャンバー内で1週間生育させた。芽生えを花ちゃん培養土(花ごころ):バーミキュライトを1:1に混ぜた培養土に定植し、25℃、16L8Dの条件で生育させ、移植後2-3週の個体をインフィルトレーションに用いた。1 mLシリンジを用いて葉の裏からインフィルトレーションを行った。接種後の植物は乾燥しないように保湿を行い、26-30℃、16L8Dの環境下で生育させた。

[0135] <T7EIアッセイによる変異検出>

接種してから7日後に直径8mmのパンチを使用して接種部位を切り取り、マルチピースショッカーMB2200 (YASUI KIKAI) で破碎し、自動核酸抽出装置Maxwell (プロメガ) を使用してトータルDNAを抽出した。抽出したDNAをテンプレートとして用いて、標的配列を含むDNA領域をKOD Fx Neo (TOYOBO) を用いてPCR増幅した。PCR産物をT7 Endonuclease I (NEB) で処理し、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (SHIMADZU) で変異導入の有無を検出した。切断バンドが生じた場合、ゲノム編集が成功したと判定できる。(非

切断バンド+切断バンド)を100%とした時の切断バンドの割合(%)を算出し、ゲノム編集効率とした。その結果を図3及び表1に示す。

[0136] [表1]

	tUBQ	3×terminator	tNOS
最小値	4.7	3.7	13.8
第1四分位	14.4	45.4	27.6
第2四分位	25.1	51.6	46.3
第3四分位	29.7	53.3	49.9
最大値	52.2	63.6	59.1
p値	1.78E-06**		0.0116*

**p<0.01、*p<0.05

[0137] 35S+NbACT3+Rb7 (図3及び表1中、3×terminator)を使用した場合(実施例1のCas発現ベクター)、概ね40~50%程度の効率で変異が検出され、タバコにおいて高効率でゲノム編集を起こすことができた。また、ターミネーターとしてUBQとNOSを使用した場合よりもゲノム編集効率は高い傾向となった。

[0138] 実施例2-1. Cas発現ベクターの作製4

ガイドRNA発現カセットとして、*Arabidopsis thaliana*のU6-26プロモーターの制御下に*Solanum lycopersicum*の遺伝子内の配列を標的とするsgRNA配列が配置された発現カセットが8個タンデム(各発現カセットのsgRNAの標的遺伝子は異なる: 5'側から順に、SlGGP1、SlGAD2、SlGAD3、SlSGR、SlILCY-E、SlBIc、SlILCY-B1、SlILCY-B2)に連結されてなるベクター部分を挿入する以外は実施例1と同様にしてCas発現ベクターを得た。

[0139] 実施例2-2. Cas発現ベクターの作製5

ガイドRNA発現カセットとして、*Arabidopsis thaliana*のU6-26プロモーターの制御下に*Glycine max*のsg-5遺伝子内の配列を標的とするsgRNA配列が配置された発現カセットが4個タンデムに連結されてなるベクター部分を挿入する以外は実施例2-1と同様にしてCas発現ベクターを得た。

[0140] 実施例2-3. Cas発現ベクターの作製6

ガイドRNA発現カセットとして、*Arabidopsis thaliana*のU6-26プロモーター

一の制御下に *Perilla frutescens* のADPG遺伝子内の配列を標的とするsgRNA配列が配置された発現カセットが6個タンデムに連結されてなるベクター部分、及びカナマイシン耐性遺伝子をコードする配列を挿入する以外は実施例2-1と同様にしてCas発現ベクターを得た。

[0141] 比較例3. Cas発現ベクターの作製7

ガイドRNA発現カセットとして、*Arabidopsis thaliana* のU6-26プロモーターの制御下に *Solanum lycopersicum* の遺伝子内の配列を標的とするsgRNA配列が配置されてなる発現カセットが8個タンデム（それぞれの発現カセットのsgRNAの標的遺伝子は異なる：5'側から順に、SIGGP1、SIGAD2、SIGAD3、SIGGR、SILCY-E、SIBIc、SILCY-B1、SILCY-B2）に連結されてなるベクター部分を挿入する以外は比較例1と同様にしてCas発現ベクターを得た。

[0142] 参考例1. 発現ベクターの作製

試験例2において植物に導入する発現ベクターとして、以下の発現ベクターを作製した。

[0143] 蛍光タンパク質（tdTomato）の発現ベクターを作製した。

[0144] また、分裂細胞活性化因子として、*Zea mays* のWUS2（WUSCHEL 2）遺伝子（コード配列：配列番号10、アミノ酸配列：配列番号11）の発現ベクター、及びipt（isopentenyl transferase）遺伝子（サイトカイニン生合成遺伝子）（コード配列：配列番号12、アミノ酸配列：配列番号13）の発現ベクターを準備した。これら2つの発現ベクターは、（3）SpCas9コード配列に代えてZmWUS2コード配列又はiptコード配列を、（7）及び（8）ガイドRNA発現カセットに代えてスペーサー配列を使用する以外は、実施例1のCas発現ベクターと同様にして作製した。

[0145] 試験例2-1. ゲノム編集試験2-1

実施例2-1のCas発現ベクター及び比較例3のCas発現ベクターそれぞれを用いてゲノム編集を行い、ゲノム編集効率を比較した。また、参考例1の分裂細胞活性化因子の有無によるゲノム編集効率も比較した。具体的には以下のように行った。

[0146] <トマト無菌栽培>

トマトは市販品種である”ホーム桃太郎（タキイ種苗）”を使用した。種子を70%エタノールで洗浄後、ハイター滅菌を行い、一晩吸水させ、播種用培地（MS, 0.5% Sucrose, 0.4% ゲランガム）に広げた。

[0147] <茎頂取り出し>

操作はテーブルコーチKOACH T500-F（KOKEN）で無菌的に行った。メスで地上部を2〜3 cm程度に切り出し、滅菌水で湿らせたろ紙（ADVANTEC）の上に置いた。以降は実体顕微鏡（OLYMPUS SZX10）下で操作を行った。1 mLシリンジ（TERUMO）と注射針26G（TERUMO）を使用し、茎頂を傷つけないように葉原基を除去した。茎頂部が真上を向くように6 cmディッシュ（IWAKI）内の培地（MS basal salt, 3% Sucrose, 150 mg/L Cefotaxime, 0.01 μ M gibberellic Acid3, 0.01 μ M Kinetin, 0.6% Phytigel）にのせ一晩静置した。

[0148] <パーティクルボンバードメント>

パーティクルボンバードメントは、PDS-1000/He（Bio-Rad）を使用し、そのプロトコルを改変して行った。直径0.6 μ mの金粒子（InBio）を70%エタノールで洗浄し、滅菌水で3回すすいだ後、50%グリセロールに懸濁した。3 mgの金粒子に対し5 μ gのプラスミドを0.1M spermidine、2.5M CaCl_2 と共に混ぜた。各試験群で使用したプラスミドとそのモル比は以下の通りである。

- ・試験群1：Cas発現ベクター（実施例2-1）：tdTomato発現ベクター＝1：1
- ・試験群2：Cas発現ベクター（比較例3）：tdTomato発現ベクター＝1：1
- ・試験群3：Cas発現ベクター（実施例2-1）：tdTomato発現ベクター：ZmWUS2発現ベクター（参考例1）：ipt発現ベクター（参考例1）＝1：1：1：1

続いて、70%エタノールで洗浄後、100%エタノールに懸濁した。準備した金粒子を懸濁しながらマクロキャリアの中心に均一になるように広げ、乾燥させた。650 psiのラプチャーディスク2枚をretaining capに、金粒子をのせたマクロキャリアとストッピングスクリーンをMicrocarrier Launch Assemblyにはめ、PDS-1000本体に設置した。茎頂を乗せたディッシュをPDS-1000内に設置して打ち込みを行った後、アルミホイルで包み、一晩静置した。

[0149] <導入確認>

打ち込みの翌日、蛍光顕微鏡BZ-X810 (KEYENCE) を用いて各茎頂上のtdTomatoの輝点数を計測し、新しい培地 (MS basal salt, 3% Sucrose, 150 mg/L Cefotaxime, 0.01 μ M gibberellic Acid3, 0.01 μ M Kinetin, 0.3% Phytigel) に茎頂を移し替えた。

[0150] <移植>

打ち込み7日後に茎頂の様子を観察し、5輝点以上かつ生存している茎頂について生育培地 (MS, 3% Sucrose, 150 mg/L Cefotaxime, 0.01 μ M gibberellic Acid3, 0.01 μ M Kinetin, 0.3% Phytigel in EC02box) に移し替え、25°C、18L6Dの条件で生育した。

[0151] <T7EIアッセイによるゲノム編集の検出>

新しく展開した第5葉をサンプリングし、マルチビーズショッカーMB2200 (YASUI KIKAI) で破碎し、自動核酸抽出装置Maxwell (プロメガ) を使用してトータルDNAを抽出した。抽出したDNAをテンプレートにし、標的配列を含む断片をKOD Fx Neo (TOYOBO) を用いてPCR増幅した。PCR産物をT7 Endonuclease I (NEB) で処理し、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (SHIMADZU) で変異導入の有無を検出した。結果を表2に示す。

[0152]

[表2]

解析数	各遺伝子ごとの変異個体数								8遺伝子中いずれかの 遺伝子が編集された 個体数	ゲノム編集効率 (%)
	SIGAD2	SIGAD3	SISGR	SIB1c	SILCY-E	SILCY-B1	SILCY-B2	SIGGP		
35Sターミネーター +ACTターミネーター +Rb7 MAR	118	0	2	3	6	2	0	2	0	5.9
NOSターミネーター 35Sターミネーター +ACTターミネーター +Rb7 MAR +ZmWUS2 +ipt	83	0	1	2	2	0	0	0	0	2.4
	99	3	3	6	6	2	1	3	1	9.1

[0153] NOSターミネーターを使用した場合（比較例3のCas発現ベクター）は2.4%の

割合で変異導入を検出したが、35Sターミネーター+NbACT3ターミネーター+Rb7 MARを使用した場合（実施例2-1のCas発現ベクター）には5.1%となり、NOSターミネーターを使用した場合の2.1倍となった。また、ZmWUS2発現ベクター及びipt発現ベクター（参考例1の発現ベクター）をゲノム編集ベクターと共に打ち込んだ場合の変異導入率は9.1%となり、ZmWUS2、iptを入れていない場合の1.8倍となった。

[0154] <次世代におけるゲノム編集の検出>

上記で得られた変異導入個体を生育させ、次世代種子を得た。得られた種子を播種し、複数個体の各子葉からトータルDNAを抽出した。抽出したDNAをテンプレートにし、SGR遺伝子上の標的配列を含む断片をKOD Fx Neo (TOYOBO) を用いてPCR増幅し、サンガーシーケンス法により変異の有無を解析した。その結果、変異が100%導入された「変異ホモ」、50%導入された「変異ヘテロ」、変異が導入されていない「変異なし」が分離して検出され、次世代個体に変異が伝達されていることが確認できた。

[0155] 試験例2-2. ゲノム編集試験2-2

実施例2-2のCas発現ベクターを用いてゲノム編集を行った。具体的には以下のようにして行った。

[0156] <ダイズ無菌栽培>

ダイズは市販品種である”フクユタカ”を使用した。塩素ガス滅菌法により滅菌処理した種子を湿らせたプロワイプ上に置いて吸水させた。

[0157] <茎頂取り出し>

試験例2-1と同様にして行った。

[0158] <パーティクルボンバードメント>

パーティクルボンバードメントは、試験例2-1（試験群3）と同様にして行った。

[0159] <導入確認>

打ち込みの翌日、蛍光顕微鏡BZ-X810 (KEYENCE) を用いて各茎頂上のtdTomatoの輝点数を計測し、新しい培地 (MS basal salt, 3% Sucrose, 25 mg/L M

eropenem, 0.01 μ M gibberellic Acid3, 0.01 μ M Kinetin, 0.3% Phytigel) に茎頂を移し替えた。

[0160] <移植>

打ち込み7日後に茎頂の様子を観察し、1輝点以上かつ生存している茎頂について生育培地 (MS, 3% Sucrose, 25 mg/L Meropeneme, 0.01 μ M gibberellic Acid3, 0.01 μ M Kinetin, 0.3% Phytigel in EC02box) に移し替え、25℃、18L6Dの条件で生育した。

[0161] <サンガーシークエンスによる変異検出>

新しく展開した第5葉からトータルDNAを抽出した。抽出したDNAをテンプレートにし、標的配列を含む断片をKOD Fx Neo (TOYOBO) を用いてPCR増幅し、サンガーシークエンス法により配列情報を得た (図4a)。得られた配列情報をもとに、解析ソフト「DECODR」を使用して変異の有無を解析した結果、4塩基欠失が検出された (図4b)。

<次世代におけるゲノム編集の検出>

上記した当代で変異導入を確認できた個体を生育し、得られた次世代種子で変異が導入されているかを試験例2-1と同様にして解析した。その結果、当代で検出された4塩基欠失と同じ変異が検出され、次世代個体に変異が伝達されていることが確認された。

[0162] 試験例2-3. ゲノム編集試験2-3

実施例2-3のCas発現ベクターを用いてゲノム編集を行った。具体的には以下のようにして行った。

[0163] <エゴマ植物の準備>

エゴマは”白川晩生”を使用し、一晩吸水させた種子を土に播種して栽培した。

[0164] <茎頂取り出し>

試験例2-1と同様にして行った。

[0165] <パーティクルボンバードメント>

試験例2-1 (試験群3) と同様にして行った。

[0166] <導入確認>

打ち込みの翌日、蛍光顕微鏡BZ-X810 (KEYENCE) を用いて各茎頂上のtdTomatoの輝点数を計測し、新しい培地 (MS basal salt, 3% Sucrose, 25 mg/L Meropeneme, 0.01 μ M gibberellic Acid3, 0.01 μ M Kinetin, 0.3% Phytage l) に茎頂を移し替えた。

[0167] <移植>

打ち込み7日後に茎頂の様子を観察し、5輝点以上かつ生存している茎頂について生育培地 (MS, 3% Sucrose, 25 mg/L Meropeneme, 0.01 μ M gibberellic Acid3, 0.01 μ M Kinetin, 0.3% Phytage l in EC02box) に移し替えた。

[0168] <CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) による変異検出>

新しく展開した第5葉からトータルDNAを抽出した。抽出したDNAをテンプレートにし、標的配列を含む断片をKOD Fx Neo (TOYOBO) を用いてPCR増幅した。PCR産物をカラム精製後、BsrGI(NEB)及びSspI(NEB)処理し、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (SHIMADZU)で変異導入の有無を解析した。非切断バンドが生じた場合、ゲノム編集が生じたと判定できる。(非切断バンド+切断バンド)を100%とした時の非切断バンドの割合(%)を算出し、ゲノム編集効率とした。BsrGI処理の結果を図5(a)、SspI処理の結果を図5(b)に示す。CAPS解析の結果、約2%程度の変異導入が検出された。

[0169] 比較例4. Cas発現ベクターの作製8

Casタンパク質発現カセットにおいて、(4)、(5)、及び(6)に代えて、(4” ”) Nicotiana tabacumのエクステンシンのターミネーター(配列番号14)が組み込まれたCasタンパク質発現カセットを挿入する以外は実施例1と同様にしてCas発現ベクター(図7)を得た。

[0170] 実施例3. Cas発現ベクターの作製9

Casタンパク質発現カセットにおいて、(4)、(5)、に代えて、(4” ”) Nicotiana tabacumのエクステンシンのターミネーター(配列番号14)、(6)に代えてA. gossypiiのTEF(translation elongation factor)インシュレーター(配列番号18)が組み込まれたCasタンパク質発現カセットを挿入する以外は実

施例1と同様にしてCas発現ベクター(図7)を得た。

[0171] 実施例4. Cas発現ベクターの作製10

Casタンパク質発現カセットにおいて、(4)、(5)、に代えて、(4'') Nicotiana tabacumのエクステンシンのターミネーター(配列番号14)、(6)に代えてSea urchinのArs(arylsulfatase) インシュレーター(配列番号17)が組み込まれたCasタンパク質発現カセットを挿入する以外は実施例1と同様にしてCas発現ベクター(図6)を得た。

[0172] 実施例5. Cas発現ベクターの作製11

Casタンパク質発現カセットにおいて、(4)、(5)、に代えて、(4'') Nicotiana tabacumのエクステンシンのターミネーター(配列番号14)、(6)に代えてHumanのBead1(blocking element alpha/delta-1 of the human T-cell receptor α/δ locus) インシュレーター(配列番号16)が組み込まれたCasタンパク質発現カセットを挿入する以外は実施例1と同様にしてCas発現ベクター(図7)を得た。

[0173] 実施例6. Cas発現ベクターの作製12

Casタンパク質発現カセットにおいて、(4)、(5)、に代えて、(4'') Nicotiana tabacumのエクステンシンのターミネーター(配列番号14)、(6)に代えてDrosophilaのGypsyインシュレーター(配列番号15)が組み込まれたCasタンパク質発現カセットを挿入する以外は実施例1と同様にしてCas発現ベクター(図7)を得た。

[0174] 実施例7. Cas発現ベクターの作製13

Casタンパク質発現カセットにおいて、(4)、(5)、に代えて、(4'') Nicotiana tabacumのエクステンシンのターミネーター(配列番号14)、(6)に代えてYeastのTEF2 (translation elongation factor 2)インシュレーター(配列番号19)が組み込まれたCasタンパク質発現カセットを挿入する以外は実施例1と同様にしてCas発現ベクター(図7)を得た。

[0175] 試験例3. ゲノム編集試験3

実施例3～7のCas発現ベクターと比較例4のCas発現ベクターをそれぞれ用い

てゲノム編集を行い、その変異導入率を比較した。方法については試験例1と同様に実施した。

[0176] 代表例として、実施例4と比較例4の結果を図8に示す。Nicotiana tabacumのエクステンシンのターミネーターにSea urchinのArsインシュレーターを融合させた場合に、44%以上の変異導入率が検出され、タバコにおいて高効率でゲノム編集を引き起こすことができた。Sea urchinのArsインシュレーターを用いた場合（実施例4）は、他のインシュレーターを用いた実施例3及び5～7に比べて、ゲノム編集効率が非常に高かった。

[0177] 実施例8. MAD7発現ベクターの作製

ジェミニウイルスベクター(bean yellow dwarf virus(BeYDV))の配列を含むpTTK352バイナリーベクターに、MAD7タンパク質発現カセット、及びガイドRNA発現カセットを挿入して、MAD7発現ベクターを得た。

[0178] MAD7発現ベクターは次のようにして作製した。既報(Tsutsui et al. (2016) pKAMA-ITACHI Vectors for Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout in Arabidopsis thaliana, Plant and Cell Physiology, Vol.58 (Issue 1), pp.46-56)に記載のpKIRベクター(バイナリー)のLeft BorderとRight Borderの間に人工合成したBeYDV由来の配列をシームレスクロニング法により挿入した。BeYDV由来のMPとCPは削除しており、Replicase proteinsをコードする配列、long intergenic region(LIR)及びsmall intergenic region(SIR)を利用した。

[0179] 挿入したMAD7タンパク質発現カセットは、5'末端側から順に、
(1)Cestrum yellow leaf curling virus(CmYLCV)プロモーター(配列番号1)、
(2)dMac3配列(配列番号2)、
(3) エピトープタグ及び核移行シグナルを付加した形式のMAD7タンパク質コード配列 (配列番号44)、
(4)カリフラワーモザイクウイルスの35Sターミネーター(配列番号4)、
(5)Nicotiana benthamianaのACT3(ACTIN3) (NbACT3)ターミネーター(配列番号5)、

(6) *Nicotiana tabacum* の Rb7 スキャフォールド/マトリックス結合領域 (MAR) (配列番号6)、

が配置されてなるDNAである。

挿入したガイドRNA発現カセットは、5' 末端側から順に、

(7) カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター(配列番号45)、

(8) hammerhead (HH) ribozyme (配列番号46)

(9) ダイレクトリピート配列(配列番号47)

(10) スペーサーとしてベンサミアナタバコXT1遺伝子由来の配列(配列番号48)、

(11) hepatitis delta virus (HDV) ribozyme(配列番号49)

(12) Nosターミネーター(配列番号50)

が配置されてなるDNAである。

[0180] 挿入方法は次のとおりである。Lampropoulosら(2013)の方法を一部改変したGolden Gate法を用いた。上記の配列が含まれるカセットをNEB Golden Gate Assembly Kitを用いてGolden Gate反応を行い、BeYDV由来のLIR配列とSIR配列の間に組み上げることで挿入した。反応条件は上記キットの推奨プロトコルに準じて行った。各カセット間の連結用の塩基配列(4塩基)として、上記1の配列を入れたカセットの直上にACCT、上記1の配列を入れたカセットと上記2の配列を入れたカセットの間にAACA、上記2の配列を入れたカセットと上記3の配列を入れたカセットの間にGGCT、上記4~6の配列を入れたカセットと上記7~12の配列を入れたカセットの間にACTA、上記7~12の配列を入れたカセットの直下にGTATを挿入した。また、上記3の配列を入れたカセットと上記4~6の配列を入れたカセットの間には連結用の塩基配列としてTCAG+46塩基+CTGCを挿入した。

[0181] 試験例4. ゲノム編集試験4

実施例8のエフェクター発現ベクター及びサイレンシングサプレッサー発現ベクター(pDGB3alpha2_35S:P19:Tnos、文献Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palaci J, Castelijns B, Forment J, Ziarsolo P, Blanca J, Gr

anell A, Orzaez D. (2013) GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiol.* 162(3):1618-1631) を用いて植物においてゲノム編集試験を行い、その変異導入率を解析した。具体的には以下のようにして行った。

[0182] <アグロバクテリウムの準備>

実施例8のエフェクター発現ベクター及びサイレンシングサプレッサー発現ベクターをエレクトロポレーション法により *Rhizobium radiobacter* strain GV3101 に導入し、抗生物質を含むLBプレートに撒いて28℃で2～3日間培養した。抗生物質を含むLB液体培地3mLでシングルコロニーを一晩前培養(28℃, 180rpm)し、LB液体培地7mLを加えて2時間培養後(28℃, 180rpm)、集菌した。Induction buffer (10mM MES, 100μM Acetosyringone, pH5.5 with NaOH) に再懸濁し、2-3時間誘導を行った。Infiltration buffer(5mM MES, pH5.5 with NaOH)に再懸濁後、各アグロ菌液をOD=0.7となるように調整し、等量ずつ混ぜて、接種用菌液とした。

[0183] <タバコ葉へのインフィルトレーション>

使用する *Nicotiana benthamiana* は、種子をハイター滅菌後、播種培地に広げ、4℃暗所に4日間静置後に25℃、16時間明期8時間暗期サイクル(16L8D)のチャンバー内で1週間生育させた。芽生えを花ちゃん培養土(花ごころ):バーミキュライトを1:1に混ぜた培養土に定植し、26-30℃、16L8Dの条件で生育させ、移植後2-3週の個体をインフィルトレーションに用いた。1 mL シリンジを用いて葉の裏からインフィルトレーションを行った。接種後の植物は乾燥しないように保湿を行い、26-30℃、16L8Dの環境下で生育させた。

[0184] <CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) による変異検出>

接種してから7日後に直径8mmのパンチを使用して接種部位を切り取り、マルチピースショッカーMB2200(YASUI KIKAI)で破碎し、自動核酸抽出装置Maxwell(プロメガ)を使用してトータルDNAを抽出した。抽出したDNAをテンプレートとして用いて、標的配列を含むDNA領域をKOD Fx Neo(TOYOBO)を用いてPCR増幅した。PCR産物をカラム精製後(MACHERY-NAGEL)、EcoRI(NEB)で処理し、

DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置MultiNA (SHIMADZU)で変異導入の有無を検出した。非切断バンドが生じた場合、ゲノム編集が生じたと判定できる。(非切断バンド+切断バンド)を100%とした時の非切断バンドの割合(%)を算出し、ゲノム編集効率とした。その結果を図9に示す。

[0185] <結果>

CAPS解析の結果、ゲノム編集ツールMAD7を用いた場合においても、34%の変異導入率が検出された。従って、Cas9に加えて、MAD7においても高効率でゲノム編集を引き起こすことができ、様々なゲノム編集ツールに対して当該ベクターは適用可能と考えられる。

[0186] 参考例2. 発現ベクターの作製

試験例5において植物に導入する発現ベクターとして、以下の発現ベクターを作製した。

[0187] Cas発現ベクターはガイドRNA発現カセットとして、*Arabidopsis thaliana*のU6-26プロモーターの制御下に*Solanum lycopersicum*のFAD7遺伝子配列を標的とするsgRNA配列が配置された発現カセットが7個タンデムに連結されてなるベクター部分を挿入する以外は実施例1と同様にしてCas発現ベクターを作製した。

[0188] 分裂細胞活性因子として、*Arabidopsis thaliana*のCUC1(CUP-SHAPED COTYLEDON 1)遺伝子(NAC転写因子)(コード配列:配列番号51、アミノ酸配列:配列番号30)の発現ベクター、N末端にあるDDK signal receiver domainを欠失させた*Arabidopsis thaliana*のARR1(*Arabidopsis Response Regulator 1*)遺伝子(コード配列:配列番号52、アミノ酸配列:配列番号31)の発現ベクター、*Arabidopsis thaliana*のCycD2;1遺伝子(コード配列:配列番号53、アミノ酸配列:配列番号32)の発現ベクター、631-1042番目のアミノ酸を欠失させた*Nicotiana tabacum*のmyb A2遺伝子(MYB3R転写因子)(コード配列:配列番号54、アミノ酸配列:配列番号33)の発現ベクター、*Arabidopsis thaliana*のE2F3遺伝子(コード配列:配列番号55、アミノ酸配列:配列番号34)の発現ベクター、*Arabidopsis thaliana*のDPA遺伝子(コード配列:配列番号56、アミノ酸配列:配列番号35)の発現ベクター。

5)の発現ベクター、*Arabidopsis thaliana*のHEC1遺伝子(bHLH転写因子)(コード配列:配列番号57、アミノ酸配列:配列番号36)の発現ベクター、ドミナントネガティブになるようにアミノ酸変異を導入した*Arabidopsis thaliana*のPP2AC1-5遺伝子(プロテインホスファターゼ2)(コード配列:配列番号58-62、アミノ酸配列:配列番号37~41)の発現ベクターを準備した。

[0189] 上記に記載した12種類の発現ベクターはSpCas9コード配列に代えて各分裂細胞活性因子のコード配列を、ガイドRNA発現カセットに代えてスパーサー配列を挿入する以外は実施例1のCas発現ベクターと同様にして作製した。

[0190] また、*Solanum lycopersicum*のTON2(TONNEAU 2)遺伝子(コード配列:配列番号63アミノ酸配列:配列番号42)の発現抑制(RNAi)ベクターを準備した。

[0191] TON2発現抑制ベクターはSpCas9コード配列に代えて、TON2コード配列を標的とするihpRNA(Intron-containing hairpin RNA)を形成するために5'末端側から順にTON2遺伝子の標的配列(配列番号64)、連結用の塩基配列(ACGA)、pdkイントロン(配列番号65)、連結用の塩基配列(TCGT)、TON2遺伝子標的配列の逆相補的配列を、ガイドRNA発現カセットに代えてスパーサー配列を挿入する以外は実施例1のCas発現ベクターと同様にして作製した。

[0192] 試験例5. ゲノム編集試験5

参考例2の分裂細胞活性化因子の有無によるゲノム編集効率を比較した。具体的には以下のようにして行った。

[0193] 〈トマト無菌栽培〉

試験例2-1と同様に行った。

[0194] 〈茎頂取り出し〉

試験例2-1と同様に行った。

[0195] 〈パーティクルボンバードメント〉

試験例2-1と同様に行った。

[0196] 各試験群で使用したプラスミドとそのモル比は以下の通りである。

- ・試験群1:Cas発現ベクター:tdTomato発現ベクター=1:1
- ・試験群2:Cas発現ベクター:tdTomato発現ベクター:ZmWUS2発現ベクター(参

考例1) : ipt発現ベクター (参考例1) =1:1:1:1

・ 試験群3: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: AtCUC1発現ベクター=1:1:1

・ 試験群4: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: AtARR1 ΔDDK発現ベクター=1:1:1

・ 試験群5: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: AtCycD2;1発現ベクター=1:1:1

・ 試験群6: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: NtMYBA2 Δ631-1042発現ベクター=1:1:1

・ 試験群7: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: AtE2F3発現ベクター: Dpa発現ベクター=1:1:1:1

・ 試験群8: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: AtHEC1発現ベクター=1:1:1

・ 試験群9: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: ZmWUS2発現ベクター (参考例1) : ipt発現ベクター (参考例1) : AtCUC1発現ベクター: AtARR1 ΔDDK発現ベクター: AtCycD2;1発現ベクター: NtMYBA2 Δ631-1042発現ベクター: AtE2F3発現ベクター: Dpa発現ベクター=1:1:1:1:1:1:1:1:1:1

・ 試験群10: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: PP2AC1発現ベクター: PP2AC2発現ベクター: PP2AC3発現ベクター: PP2AC4発現ベクター: PP2AC5発現ベクター=1:1:1:1:1:1:1

・ 試験群11: Cas発現ベクター: tdTomato発現ベクター: TON2発現抑制ベクター=1:1:1

〈導入確認〉

試験例2-1と同様に行った。

[0197] 〈移植〉

試験例2-1と同様に行った。

[0198] 〈サンガーシーケンス法によるゲノム編集の検出〉

新しく展開した第5葉をサンプリングし、抽出Buffer (1M KCl, 10mM EDTA,

100mM Tris-HCl with HCl) 内でペッスルを使用してBufferが緑色になるまで葉を破碎した。抽出液をVortexで良く攪拌した後、95℃で10分保温した。保温後、再度Vortexで良く攪拌して、遠心後、上精をPCRのテンプレートとして用いた。

[0199] 標的配列を含む断片をKOD Fx Neo(TOY0B0)を用いてPCR増幅した。PCR産物をExo-CIP Rapid PCR Cleanup Kit(NEB)による処理後、サンガーシーケンス法により変異導入の有無を解析した。試験群1、試験群2 (ZmWUS2+ipt)、試験群3 (AtCUC1)、試験群5 (AtCyc2;1)、試験群7 (AtE2F3+Dpa)、及び試験群11 (TON2) の結果を表3に示す。

[0200] <結果>

[0201] [表3]

分裂細胞活性因子	茎頂上 平均種点数	解析数	編集個体数	ゲノム編集 効率 (%)
なし	2.5	35	2	5.7%
ZmWUS2+ipt	2.1	36	5	13.9%
AtCUC1	2.4	27	2	7.4%
AtCyc2;1	3.1	29	3	10.3%
AtE2F3+Dpa	4.2	30	3	10.0%
TON2	2.4	34	3	8.8%

[0202] 分裂細胞活性因子を導入しない場合の変異導入率 (5.7%) と各因子を入れた場合を比較すると、ZmWUS2+ipt、AtCUC1、AtCyc2;1、AtE2F3+Dpa及びTON2を使用した場合は変異導入率が増加した (各々、13.9%、7.4%、10.3%、10.0%及び8.8%)。これらの場合は、他の分裂細胞活性因子を導入した場合に比べて非常に高かった。

[0203] <次世代におけるゲノム編集の検出>

第5葉で変異導入を確認できた個体を生育し、得られた次世代種子を播種し、発芽した子葉を上記に記述した第5葉検出時と同じ方法を用いて検出を実施した。その結果、次世代個体においても変異が検出された。

[0204] 実施例9. LbCpf1発現ベクターの作製

ジェミニウイルスベクター(bean yellow dwarf virus(BeYDV))の配列を含

むpTTK352バイナリーベクターに、LbCpf1タンパク質発現カセット、及びガイドRNA発現カセットを挿入して、LbCpf1発現ベクターを得た。

[0205] LbCpf1発現ベクターに関して、

(3) にエピトープタグ及び核移行シグナルを付加した形式のLbCpf1タンパク質コード配列（配列番号67）、

(9) にLbCpf1用のダイレクトリピート配列（配列番号68）、

を用いる以外は実施例8と同様にして発現ベクターを作製した。

[0206] 試験例6. ゲノム編集試験6

実施例9のエフェクター発現ベクター及びサイレンシングサプレッサー発現ベクター(pDGB3alpha2_35S:P19:Tnos、文献Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palaci J, Castelijns B, Forment J, Ziarsolo P, Blanca J, Granell A, Orzaez D. (2013) GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. Plant Physiol. 162(3):1618-1631)を用いて植物においてゲノム編集試験を行い、その変異導入率を解析した。具体的には試験例4と同様に実施した。

[0207] 〈結果〉

CAPS解析の結果、ゲノム編集ツールLbCpf1を用いた場合においても、MAD7と同様に変異導入が検出された。従って、Cas9及びMAD7に加えて、さらにLbCpf1においてもゲノム編集を引き起こすことができ、様々なゲノム編集ツールに対して当該ベクターは適用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットと核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列とを含むポリヌクレオチドであって、前記部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットが、
- (b) 部位特異的ヌクレアーゼ配列、並びに
 - (c) ターミネーターを含む3′ UTR
- を含む、ポリヌクレオチド。
- [請求項2] 前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列がインシュレーターである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項3] 前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列が前記3′ UTRに含まれる、請求項1又は2に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項4] 前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列がスキャフォールド／マトリックス結合領域以外のインシュレーターである、請求項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [請求項5] 前記インシュレーターがArsインシュレーター、Gypsyインシュレーター、Bead1インシュレーター、TEFインシュレーター、及びTEF2インシュレーターからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項4に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項6] 前記インシュレーターがArsインシュレーターである、請求項5に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項7] 前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列がスキャフォールド／マトリックス結合領域である、請求項1～3のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [請求項8] 前記ターミネーターが少なくとも2つのターミネーターの連結体である、請求項1～7のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [請求項9] 前記3′ UTR内且つ前記ターミネーターの下流に前記核移行性因子及び／又は核内構造物に結合する配列が配置されている、請求項1～8のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

- [請求項10] 前記ターミネーターが35Sターミネーター、ACT3ターミネーター、及びエクステンシンターミネーターからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1～9のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [請求項11] 前記部位特異的ヌクレアーゼ発現カセットが、
(a) プロモーター
を含む、請求項1～10のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [請求項12] 前記プロモーターが茎頂発現プロモーターである、請求項11に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項13] 前記プロモーターがCmYLCVプロモーター、UBQプロモーター、EF-1 α プロモーター、又はRPS5Aプロモーターである、請求項11又は12に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項14] ウイルスベクター配列を含む、請求項1～13のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [請求項15] 前記ウイルスベクター配列がジェミニウイルスベクター配列である、請求項14に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項16] 前記ウイルスベクター配列がBeYDV配列である、請求項14又は15に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項17] さらに、ガイドRNA発現カセットを含む、請求項1～16のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [請求項18] 請求項1～17のいずれかに記載のポリヌクレオチドからなる、植物ゲノム編集用ベクター。
- [請求項19] 請求項1～17のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、植物ゲノム編集用キット。
- [請求項20] 請求項1～17のいずれかに記載のポリヌクレオチドを植物に導入することを含む、植物ゲノム編集方法。
- [請求項21] さらに、前記ポリヌクレオチドの導入部位に分裂細胞活性化因子を導入することを含む、請求項20に記載の植物ゲノム編集方法。
- [請求項22] 請求項1～17のいずれかに記載のポリヌクレオチドを植物に導入す

ることを含む、ゲノム編集された植物の製造方法。