

(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2009-502143

(P2009-502143A)

(43) 公表日 平成21年1月29日(2009.1.29)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
			C 1 2 Q 1/68	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2008-523078 (P2008-523078)	(71) 出願人	506261257
(86) (22) 出願日	平成18年7月28日 (2006.7.28)		ハイブリッド バイオサイエンスーズ ビーティーワイ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年3月17日 (2008.3.17)		オーストラリア国 ウェスタン オーストラリア州 6014, フロリット, エヴァンダール ストリート 80, エヴァンダール ハウス
(86) 国際出願番号	PCT/AU2006/001065	(74) 代理人	100091683
(87) 国際公開番号	W02007/012138		弁理士 ▲吉▼川 俊雄
(87) 国際公開日	平成19年2月1日 (2007.2.1)	(72) 発明者	ケイ, ピーター ハミルトン
(31) 優先権主張番号	2005904085		オーストラリア国 ウェスタン オーストラリア州 6014, フロリット, エヴァンダール ストリート 80
(32) 優先日	平成17年7月29日 (2005.7.29)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 雑種強勢又は雑種衰弱を促進する遺伝子とその産生物の同定とその応用

(57) 【要約】

本発明は雑種強勢、雑種衰弱の誘発及び／又は疾患の診断、予後及び治療に有用な候補遺伝子及びそれによるコード化タンパク質の同定法に関する。特に本発明は動物又は植物で雑種強勢又は雑種衰弱を産生できる候補遺伝子の同定法に関し、(i) 雑種強勢又は雑種衰弱を示す動物又は植物から単離の候補遺伝子の対立遺伝子のmRNA配列を、該動物又は植物の親から単離の対立遺伝子のヌクレオチド配列と比較し、(ii) アミノ酸配列変異をコードした雑種強勢又は雑種衰弱を示す該動物又は植物の対立遺伝子でのmRNA配列の差異物を同定し、且つ (iii) 該動物又は植物の候補遺伝子の対立遺伝子間のアミノ酸配列変異を、この候補遺伝子内の二つ以上の異なるエクソン内に位置するmRNA配列によるコード化を確認する段階を含む同定法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物又は植物で雑種強勢又は雑種衰弱を産生出来る候補遺伝子同定法で、

- (i) 雑種強勢又は雑種衰弱を示す動物又は植物から単離の候補遺伝子の mRNA 配列を、前記動物又は植物の親から単離の対立遺伝子のヌクレオチド配列を比較し、
- (ii) アミノ酸配列変異をコードした雑種強勢又は雑種衰弱を示す前記動物又は植物での前記対立遺伝子の mRNA 配列の差異物を同定し、且つ
- (iii) 前記動物又は植物での前記候補遺伝子の対立遺伝子間の前記アミノ酸配列変異を、前記候補遺伝子内の二つ以上の異なるエクソン内に位置する mRNA 配列によりコード化されるのを確認する

段階を含む同定法。

10

【請求項 2】

前記アミノ酸配列変異が保守的修飾変異である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記アミノ酸配列変異が非保守的修飾変異である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 mRNA 配列の差異同定段階が前記植物又は動物で単離の前記 mRNA の配列決定段階を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記植物が大麦、ライ麦、サトウモロコシ、メイズ (maize)、大豆、小麦、トウモロコシ (corn)、じゃがいも、綿花、米、菜種 (カノーラ油を含む)、ひまわり、ムラサキウマゴヤシ、サトウキビ、バナナ、ブラックベリー、ブルーベリー、イチゴ、ラズベリー、カンタロップ、にんじん、カリフラワー、コーヒー、キュウリ、なす、ブドウ、ハネデューメロン、レタス、マンゴー、メロン、タマネギ、パパイア、エンドウ豆、コショウ、パイナップル、ほうれん草、スカッシュ、スイートコーン、たばこ、トマト、スイカ、バラ科果実 (リンゴ、桃、梨、サクランボ及びプラムのような) 及びアブラナ科野菜 (ブロッコリー、キャベツ、カリフラワー、もやし及びコールラビのような) からなる一群から選択し、表現形が変化しても良い他作物、果物及び野菜としては、大麦、カラント、アボカド、ミカン、レモン、グレープフルーツ及びタンジェリンのような柑橘類果物、アーティチョーク、チェリー類、クルミとピーナツのようなナッツ類、エンダイブ、リーキ、クズウコン、ビート、キャッサバ、かぶ、大根、ヤムイモ、サツマイモのような根類及び豆類である請求項 1 に記載の方法。

20

30

【請求項 6】

前記動物が哺乳類か魚である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記哺乳類が哺乳類の霊長目、げっ歯目、ウサギ目、鯨目、食肉目、奇蹄目及び偶蹄目から選択する請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記偶蹄目はイノシシ科、ベッカリー科、カバ科、らくだ科、マメジカ科、キリン科、シカ科、プロングホーン科及びウシ科の 9 つの科の一つから選択する請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

ウシ科から選択する前記動物が有蹄動物である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記有蹄動物が雌牛又は雄牛、バイソン、バファロー、羊、オオツノヒツジ、ウマ、ポニー、ロバ、ラバ、シカ、ヘラジカ、カリブー、山羊、水牛、ラクダ、ラマ、アルパカ及び豚からなる一群から選択する請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記動物が魚である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

50

前記魚が縞模様の魚、鯉、鮭、カダヤシ、テンチ、ヤツメウナギ、丸ハゼ、テラピア及びマスからなる一群から選択する請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記動物がヒトである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

雑種強勢又は雑種衰弱をもたらす因子同定法で、

(i) 候補遺伝子の対立遺伝子による複数種のコード化 mRNA 又はタンパク質の存在又は不在を同定し、

(ii) 複数種の mRNA 又はタンパク質が存在する場合には、前記種がそれぞれ二つ以上のエクソン変異体に対応するヌクレオチド配列変異体又はアミノ酸配列変異体を有するかどうかを解析し、段階 (ii) で複数種の mRNA 又はタンパク質の存在が雑種強勢又は雑種衰弱を指示する段階を含む同定法。

【請求項 1 5】

動物又は植物の雑種強勢又は雑種衰弱産生法で、

(i) 候補遺伝子の対立遺伝子による複数種のコード化 mRNA 又はタンパク質の存在又は不在を同定し、

(ii) 複数種の mRNA 又はタンパク質が存在する場合には、前記種がそれぞれ二つ以上のエクソン変異体に対応するヌクレオチド配列変異体又はアミノ酸配列変異体があるかどうかを解析し、段階 (ii) で複数種の mRNA 又はタンパク質の存在が雑種強勢又は雑種衰弱を指示し、

(iii) いずれの種が前記植物又は動物で雑種強勢 (HV) 又は雑種衰弱 (HD) を促進するかを決定するために、野生型タンパク質制御機能と比較して前記複数種のタンパク質機能を決定し、

(iv) 段階 (iii) のタンパク質種のコード化ヌクレオチド配列を含むコンストラクトを調製し、

(v) 前記コンストラクトをレシピエント植物細胞又はレシピエント動物細胞に形質転換し、且つ

(vi) 前記コンストラクトを発現する植物又は動物を前記細胞から再生する段階を含む方法。

【請求項 1 6】

植物又は動物でのハイブリッド mRNA の存在又は不在検出法であって、

植物又は動物からの mRNA 単離段階を含み、前記 mRNA のヌクレオチド配列を前記植物又は動物の対立遺伝子の対応コード配列と比較する、

植物又は動物でのハイブリッド mRNA の存在又は不在検出法。

【請求項 1 7】

遺伝子の異なる対立遺伝子のエクソンを含む合成遺伝子を含むコンストラクトで、異なる対立遺伝子間で変異が起こるアミノ酸配列変異体を、前記対立遺伝子がコードするコンストラクト。

【請求項 1 8】

植物又は動物の雑種衰弱を克服し、及び／又は植物又は動物に雑種強勢を誘発するために、インビトロ又はインビボで産生のハイブリッド mRNA 配列分子の使用で、前記ハイブリッド mRNA を前記動物又は植物に導入する段階を含むハイブリッド mRNA 分子の使用。

【請求項 1 9】

前記ハイブリッド mRNA を前記動物又は植物に導入する段階が形質転換又は相同組み替えによる請求項 1 8 に記載の使用。

【請求項 2 0】

植物への形質転換段階が相同組み替え、微粒子銃、ポリエチレングリコール (PEG) 仲介形質転換、電気穿孔、炭化ケイ素繊維仲介形質転換、又はアグロバクテリウム仲介形質転換からなる一群から選択する請求項 1 9 に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

植物又は動物の雑種衰弱を克服し、及び／又は植物又は動物に雑種強勢を誘発するために、インビトロ又はインビボで産生のハイブリッドタンパク質分子の使用で、前記ハイブリッドタンパク質を前記動物又は植物に導入する段階を含むハイブリッドタンパク質の使用。

【請求項 2 2】

前記ハイブリッドタンパク質を前記動物、ヒト又は植物に導入する段階が、前記ハイブリッドタンパク質を経口、局所又は非経口投与による請求項 2 1 に記載の使用。

【請求項 2 3】

請求項 1 乃至 1 3 のいずれかの一つに記載の方法で同定した候補遺伝子を動物又は植物に投与する段階を含む疾患の治療法又は予防法。

10

【請求項 2 4】

請求項 1 4 に記載の方法で同定した因子を動物又は植物に投与する段階を含む疾患の治療法又は予防法。

【請求項 2 5】

請求項 1 7 に記載のコンストラクトを動物又は植物に投与する段階を含む疾患の治療法又は予防法。

【請求項 2 6】

疾患の治療又は予防用薬剤の調合で請求項 1 乃至 1 3 のいずれかの一つに記載の方法で同定した候補遺伝子の使用。

20

【請求項 2 7】

疾患の治療又は予防用薬剤の調合で請求項 1 4 に記載の方法で同定した因子の使用。

【請求項 2 8】

疾患の治療又は予防用薬剤の調合で請求項 1 7 に記載のコンストラクトの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は雑種強勢、雑種衰弱及び／又は疾患診断、予後及び治療に有用な候補遺伝子とそれによるコード化タンパク質の同定法に関する。特に本発明は候補遺伝子の対立遺伝子による複数種のコード化 mRNA 又はタンパク質の存在又は不在を含む雑種強勢又は雑種衰弱をもたらす因子の同定法に関し、複数種の mRNA 又はタンパク質の存在が雑種強勢又は雑種衰弱を表示する。

30

【背景技術】

【0002】

作物類、野菜類、果物及び例えば牛、羊及び豚類のような動物の成長、生存率、害虫抵抗性又は頑強性に影響力を有する幾つかの遺伝因子が、遺伝的に無関係で生物学的な正常親の子孫で影響力がより大きいことは数百年の間認められている。この生物現象は雑種強勢 (HV) 又はヘテロシスと呼ばれる。遺伝学的に無関係な親の子孫はヘテロ接合生物と呼ばれる。

【0003】

40

殆どの正常な生物学的表現型が同一遺伝子の異なる変異形態をそれぞれが保有する生物学的欠陥の親の子孫に保持された HV の更によく知られた形態は、遺伝子内相補性又は遺伝子座間相補性 (IC) と呼ばれる。

【0004】

HV の商業的重要性と将来的有用性はどれほど強調してもし過ぎることはない。例えば農業分野だけでも HV の応用により数十億ドル収益をもたらし、遺伝学分野での最大の応用成果の一つを反映する (例えばアラム等 (Alam, et al.)、(2004 年)、ジャーナルオブチュチアンユニバーシティサイエンス (J. Zhejiang Uni. Sci.)、5 巻、p. 406 を参照)。

【0005】

50

国際食料政策研究所 (The International Food Policy Research Institute) は発展途上国世界での肉類需要が 1995 年の消費水準に比べ 2020 年には 100% 増加すると予測している (ピンストラップ・アンダーソン等 (Prinstrup-Andesen et al.)、2020 年を展望する食糧政策報告 (2020 Vision Food Policy Report)、国際食料政策研究所 (The International Food Policy Research Institute)、ワシントン (Washington)、ディストリクトオブコロンビア (DC))。食用作物に関してインドだけでも食料生産量は 2025 年には二倍にする必要があり、2050 年には予測人口増加を支えるには三倍にもなると予測されている (セングプタ等 (Sengupta, et al.)、(2001 年)、カレントゲノミックス (Curr. Genomics)、2 巻、p. 181)。将来の推算世界的食料所要量にも関わらず、食用作物増産速度は近年、特に 1990 年代に年率約 1% 減少した (コンウェイ (Conway)、テニッセン (Toennissen)、(1999 年)、ネーチャー (Nature)、402 巻、C55)。それ故将来の世界的食用作物増産速度に対する需要の充足を保証するには、HV を促進する新技術の開発と応用が不可欠である。

【0006】

HV はヘテロ接合型生物又は雑種生物で独自に合成される新規タンパク質 (ホルモン、酵素又は成長因子のような) により促進されると云う意見が長い間もたれてきた (例えば ジル (Gill) (1997 年)、遺伝学と小麦改良 (Genetics and Wheat Improvement)、エイケイ、グプタ編 (A.K. Gupta, Ed.)、(オックスフォードアンドアイビーエッチ出版社 (Oxford and IBH Publishing Co.)、ニューデリー (New Delhi)、p. 204-207) ; スキャンダリオス等 (Scandalios et al.)、(1972 年)、アーカイブバイオケミストリーバイオフィジク (Arch. Biochem. Biophys.)、153 巻、p. 695 ; ロマグノリ等 (Romagnoli et al.)、(1990 年)、セオレティカルアンドアプライドジェネティックス (Theor. Appl. Genet.)、80 巻、p. 769 ; チェン等 (Cheng et al.)、(1996 年)、チャイニーズサイエンスブリティン (Chinese Sci. Bull.)、41 巻、p. 40 参照)。

【0007】

新規タンパク質がヘテロ接合型子孫で如何に形成されるかを理解するのは常に困難なので、HV を説明するために多くの代替えモデルが提案された。近年電気回路と同類のモデル (ミルボロウ (Milborrow)、(1998 年)、ジャーナルオブエクスペリメンタルボタニー (J. Exp. Bot.)、49 巻、p. 1063) や他の数学ベースモデルが提案された (ゴードン (Gordon)、(1999 年)、ヘレディティ (Heredity)、83 巻、p. 757)。しかしバーチラー等 (Birchler et al.)、(2003 年)、ザプラントセル (The Plant Cell)、15 巻、p. 2236 及びより最近にサイド (Syed)、チェン (Chen)、(2005 年)、ヘレディティ (Heredity)、94 巻、p. 295) が記載しているように、HV 又はヘテロシス推進の根底にある分子遺伝学的機構は分からないままである。2003 年にバーチラー (Birchler) と同僚は又 “ヘテロシスの最終的な分子的説明により農業と生物工学の利益のために HV が操作出来るか否かが決まる” と予測した。

【0008】

既に 1960 年にはハイブリッドタンパク質がヘテロ接合型子孫で形成できることが示された (シュワルツ (Schwartz)、(1960 年)、プロシーディングオブナショナルアカデミーオブサイエンスユーエスエイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、46 巻、p. 1210)。同一研究者は又これらハイブリッドタンパク質により HV は推進されると仮定した。10 年以後にこの仮定は、HV と新規タンパク質又はハイブリッドタンパク質形成との関連が確認され正しいことが証明された (ウィルス (Wills)、ニコルス (Nichols)、(1972 年)、プロシーディングオブナショナルアカデミーオブサイエンスユーエスエイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、69 巻、p. 323 ; シン等 (Singh et al.)、(1975 年)、ジェネティックス (Genetics)、80 巻、p. 637)。

【0009】

より近年には新規タンパク質を産生し、且ついずれの親にも欠如の独自の mRNA 種が、異なる形態の雑種強勢を示すヘテロ接合型ニワトリで明確に同定された (サン等 (Sun

10

20

30

40

50

et al.)、(2005年)、アニマルジェネティックス (Animal Genetics)、36巻、p. 210)。

【0010】

ヘテロ接合型子孫で形成した幾つかのハイブリッドタンパク質は、HVとは対照的に頑強さ、生存率又は健康が低下し、その親のいずれかに比べ子孫で病気を引き起こす。この現象は雑種衰弱 (HD^(c)) と呼ばれる (本発明者の同時係属国際特許出願 PCT/AU2005/000141号参照)。幾つかの形態のHDは野生型の親タンパク質の活性に比べ、ヘテロ接合型子孫のハイブリッドタンパク質の不適合活性又は異常活性により直接起こり得る。この種類の人疾患の例としては、2型糖尿病と同様に全身性エリテマトーデスを患う患者の血管塞栓性疾患が挙げられる。2型糖尿病に関しては、多くの研究により新規の遺伝子コード化カルパイン類似プロテアーゼ (CAPN10) と呼ばれる酵素が疾病過程に関与することが示された。コックス (Cox) (2001年) はCAPN10の遺伝変異性に関するこれら研究の全体結果を評価し、“ハイリスクの組み合わせを形成する二つの異なる (CAPN10) ハプロタイプに関してヘテロ接合な個体は、ハロタイプの他の組み合わせ全てに比べ危険性が約3倍増加し、最小リスクのハロタイプの組み合わせに対し危険性が約7倍増加する。ハイリスクの組み合わせのハロタイプのいずれかに関してホモ接合な個体は、2型糖尿病発生の危険性増加はない”と結論した (ヒューマンモレキュラージェネティックス (Hum. Mol. Genet.)、10巻、p. 2301)。

10

【0011】

一方幾つかの形態のHDは、宿主免疫系がハイブリッドタンパク質を免疫学的に異質と認識した結果間接的に起こり得る。この種類の疾患例としては1型糖尿病と自己免疫性肝疾患が挙げられる。1型糖尿病を患う幾らかの患者は、インスリンを産生する膵臓細胞の島細胞構成物質に向う血液中に自己抗体を有する。これらの自己抗体の標的はグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD65) である。

20

【0012】

ブーチン等 (Boutin et al.)、(2003年) (ピーロスバイオロジー (PLoS Biol)、1巻、p. 68) の研究により、HDの免疫誘導モードを保持しながら、1型糖尿病の標的自己抗原GAD65に対する免疫が、異なる遺伝形態のGAD65にヘテロ接合な被験者で増加することが確認された。

【0013】

農業、園芸及び水産養殖へのHVの応用に関する大きな商業的重要性と、HVとHDの根底にある分子遺伝学的原理の理解を目的とする国際的な広範囲な研究努力にもかかわらず、今までこれら二つの表現形のいずれかを植物類、動物類又は魚で推進する遺伝子は同定されていない。これに対する主な理由は、疾患を含む有利な表現型か不利な表現型を起こす遺伝子の現在利用できる同定法又はマッピング法は、試験中生物のゲノム全体に分布する一連の遺伝子マーカーの使用に依存していることによる。通常これら遺伝子マーカーは一組の一塩基多型又はSNP類を含む。次いで関連遺伝子の場所は、どのSNP類が研究中の生物学的形質又は疾患と最も厳密に分離されるか、又は同時遺伝するかを決定して決める。幾つかの家族構成員が研究中の疾患又は表現型を有する系図でSNP解析が出来るだけ多くの世代に適用できる場合には、同時分離研究は最も有効である。疾患又は表現型がメンデル遺伝則に従って各世代を通して順送りされる場合には、関連遺伝子同定に関する本法の成功性は非常に高い。しかしHV及びHDの遺伝率がメンデル遺伝則に一致しない場合には、これらの技法はHD又はHV関与遺伝子を同定出来ない。

30

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

それ故HV及びHD促進が関与する遺伝子同定法の必要がある。更にどちらのハイブリッドタンパク質がHV又はHD誘導の原因であるかを決定する方法が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0015】

50

新規ポリペプチド又はタンパク質を合成するために、該発明者はスプライシング時に、一方の親から受け継ぐ遺伝子エクソンの3'末端を、他の親から受け継ぐ同一遺伝子の次の下流エクソンの5'末端で連結できる一次RNAスプライシング機構によりハイブリッドmRNAをインビボに産生出来ると仮定した。ここでの雑種遺伝子産物の産生機構は複合タンパク質が同一染色体の異なるDNA鎖の一次RNA種の融合、又は同一親種の異なる転写ユニットにより形成できる他のもの（例えばモンゲラード等（Mongelard et al.）、（2002年）、ジェネティックス（Genetics）、160巻、p. 1481）とは異なることを認識することは重要である。従ってモンゲラード等（Mongelard et al.）は異なるDNA鎖の二つの別転写単位の連結を記載している。対照的に該発明者は新規ハイブリッドタンパク質が合成される新規又はハイブリッドmRNAが、二つの異なる親対立遺伝子の転写単位のそれぞれのエクソン又はその一部を同一成熟mRNA分子に組み入れる生化学的経路により産生することを示した。

10

【0016】

その結果本発明の最も広い状態で、HVとHDの生物学的現型がヘテロ接合型子孫で如何に産生されるかを説明する分子遺伝学的機構を記載する。ヘテロ接合型子孫で形成されHVとHDを産生する新規遺伝構造物は、その親の遺伝可能な遺伝暗号の参照では明白ではない。

【0017】

従って第一様態では本発明は動物又は植物に雑種強勢又は雑種衰弱を産生出来る候補遺伝子の同定法を提供し、その同定法は

20

(i) 雑種強勢又は雑種衰弱を示す動物又は植物から単離の候補遺伝子の対立遺伝子mRNA配列を、該動物又は植物の親から単離の対立遺伝子のヌクレオチド配列と比較し、

(ii) アミノ酸配列変異体をコードした雑種強勢又は雑種衰弱を示す該動物又は植物の対立遺伝子mRNA配列の差異を同定し、且つ

(iii) 該動物又は植物の候補遺伝子の対立遺伝子間アミノ酸配列変異体が、候補遺伝子内の二つ以上の異なるエクソン内に位置するmRNA配列によりコード化されるのを確認する

段階を含む。

【0018】

30

第二様態では本発明は雑種強勢又は雑種衰弱をもたらす因子同定法を提供し、その同定法は

(i) 候補遺伝子の対立遺伝子による複数種のコード化mRNA又はタンパク質の存在又は不在を同定し、

(ii) 複数種のmRNA又はタンパク質が存在する場合には、該種がそれぞれ二つ以上のエクソンの変異に対応するヌクレオチド配列変異体又はアミノ酸配列変異体があるか否かを解析し、段階(ii)での複数種のmRNA又はタンパク質の存在は雑種強勢又は雑種衰弱を指示する段階を含む。

【0019】

40

第三様態では動物又は植物での雑種強勢又は雑種衰弱産生法を提供し、産生法が

(i) 候補遺伝子の対立遺伝子による複数種のコード化mRNA又はタンパク質の存在又は不在を同定し、

(ii) 複数種のmRNA又はタンパク質が存在する場合には、該種がそれぞれ二つ以上のエクソンの変異に対応するヌクレオチド配列変異体又はアミノ酸配列変異体があるか否かを解析し、段階(ii)での複数種のmRNA又はタンパク質の存在は雑種強勢又は雑種衰弱を指示し、

(iii) いずれの種が該植物又は動物でHV又はHDを促進するかを決定するために、野生型タンパク質制御機能と比較して複数種のタンパク質機能を決定し、

(iv) 段階(iii)の該タンパク質種のコード化ヌクレオチド配列を含むコンストラクトを調製し、

50

(v) 該コンストラクトをレシピエント植物細胞又はレシピエント動物細胞に形質転換し、且つ

(vi) 該コンストラクトを発現する植物又は動物を該細胞から再生する段階を含む。

【0020】

第四様態では該発明は、植物又は動物からmRNAを単離する段階を含む植物又は動物のハイブリッドmRNAの存在又は不在を検出し、該mRNAのヌクレオチド配列を植物又は動物の対立遺伝子の対応コード配列と比較する方法を提供する。

【0021】

第五様態では遺伝子の異なる対立遺伝子のエクソンを含む合成遺伝子を含むコンストラクトを提供し、対立遺伝子が異なる対立遺伝子間で変異が起こるアミノ酸配列変異体をコードする。

【0022】

更に本発明は植物又は動物の疾患を克服し、及び／又は植物又は動物に雑種強勢を有やつするために、インビボ産生ハイブリッドmRNA分子又はそれらにより翻訳されたハイブリッドタンパク質の使用に関連する。

【0023】

植物細胞は裸子植物、単子葉植物及び双子葉植物を含む任意の高等植物から単離出来るが、農業上重要な植物種全てが好ましい。好ましくい植物細胞は、大麦、ライ麦、サトウモロコシ、メイズ (maize)、大豆、小麦、トウモロコシ (corn)、じゃがいも、綿花、米、菜種 (カノーラ油を含む)、ひまわり、ムラサキウマゴヤシ、サトウキビ、バナナ、ブラックベリー、ブルーベリー、イチゴ、ラズベリー、カンタロープ、にんじん、カリフラワー、コーヒー、キュウリ、なす、ブドウ、ハネデューメロン、レタス、マンゴー、メロン、タマネギ、パパイア、エンドウ豆、コショウ、パイナップル、ほうれん草、スカッシュ、スイートコーン、たばこ、トマト、スイカ、バラ科果実 (リンゴ、桃、梨、サクランボ及びプラムのような) 及びアブラナ科野菜 (ブロッコリー、キャベツ、カリフラワー、もやし及びコールラビのような) からなる一群から選択の植物から単離する。表現型が変化しても良い他の作物、果物及び野菜としては、大麦、カラント、アボカド、ミカン、レモン、グレープフルーツ及びタンジェリンのような柑橘類果物、アーティチョーク、チェリー類、クルミとピーナツのようなナッツ類、エンダイブ、リーキ、クズウコン、ビート、キャッサバ、かぶ、大根、ヤムイモ、サツマイモのような根類及び豆類が挙げられる。本発明に使用できるかもしれない他の植物細胞としては、松、ポプラ及びユーカリのような木質種から単離の細胞が挙げられる。より好ましくは該植物細胞は米細胞、小麦細胞、大麦細胞、ライ麦細胞、サトウモロコシ細胞又はトウモロコシ細胞である。

【0024】

該植物細胞の形質転換法は、植物細胞を安定に形質転換できる技術的に周知の任意の方法を含む。適切なプロトコルはマメ科 (ムラサキウマゴヤシ、大豆、クローバー等)、セリ科 (にんじん、セロリ、アメリカボウフウ)、アブラナ科 (キャベツ、大根、菜種、ブロッコリー等)、ウリ科 (メロンとキュウリ)、イネ科 (小麦、トウモロコシ、米、大麦、きび等)、ナス科 (じゃがいも、トマト、たばこ、コショウ等) 及び種々の他作物が利用できる。アンミラート等 (Ammirato et al.) (1984年)、植物細胞培養—作物種ハンドブック (Handbook of Plant Cell Culture Crop Species)、マックミラン出版社 (Mamillan Publ. Co.) ; シマモト等 (Shimamoto, et al.)、(1989年)、ネーチャー (Nature)、338巻、p. 274-276; フロム等 (Fromm et al.)、(1990年)、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology)、8巻、p. 833-839; 及びバジル等 (Vasil et al.)、(1990年)、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology)、8巻、p. 429-434に記載のプロトコル参照。

【0025】

好ましくは植物細胞は、例えばメガヌレアーゼ1-Scel、微粒子銃、プロトプラストのPEG仲介形質転換、電気穿孔、炭化ケイ素繊維仲介形質転換、又はアグロバクテリ

10

20

30

40

50

ウム仲介形質転換の使用に基づく技法を用いる相同組み替えからなる一群から選ぶ方法で形質転換する。該発明の好ましい実施形態では、形質転換手続きは微小粒子をコンストラクト含有のDNAでコートし、レシピエント細胞をその微小粒子と接触する微粒子銃法を含む。

【0026】

第六様態では該発明により植物又は動物の雑種衰弱を克服し、及び／又は植物又は動物の雑種強勢を誘発するために、該動物又は植物へ該ハイブリッドタンパク質の導入段階を含むインビトロ又はインビボ産生ハイブリッドタンパク質分子の使用が提供される。

【0027】

動物細胞はいずれの動物から単離出来るが、哺乳類及び魚が特に有用である。適切な哺乳類源としては、霊長目、げっ歯目、ウサギ目、鯨目、食肉目、奇蹄目及び偶蹄目の構成員が挙げられる。奇蹄目と偶蹄目構成員が、それらが類似生物学であり且つ経済的重要性から特に好ましい。

【0028】

例えば偶蹄目は以下の9つの科に分布する約150種の生きた種を含む。豚（イノシシ科）、ペッカリー（ペッカリー科）、カバ（カバ科）、らくだ（らくだ科）、ネズミジカ（マメジカ科）、キリンとオカール（キリン科）、シカ（シカ科）、プロングホーン（プロングホーン科）及び牛、羊、山羊及びアンテロープ（ウシ科）。これら動物の多くは種々の国で食用動物として使用されている。本発明に関してより重要なのは、山羊、羊、牛及び豚のような経済的に重要な動物の多くが非常に類似した生物学を有し、高度にゲノム相同性を共有することである。

【0029】

奇蹄目はウマとロバを含み、両者は経済的に重要であり且つ緊密に関連している。実際にマウマとロバは雑種交配することがよく知られている。

【0030】

一実施形態では動物細胞は有蹄動物から得る。好ましくは有蹄動物は牛科動物、オービッド、シカ科動物、豚科動物、ウマ科動物及びラクダ科動物の家畜又は野生の代表者からなる一群から選ぶ。これらの代表者の例としては、雌牛又は雄牛、バイソン、バファロー、羊、オオツノヒツジ、ウマ、ポニー、ロバ、ラバ、シカ、ヘラジカ、カリブー、山羊、水牛、ラクダ、ラマ、アルパカ及び豚である。特に牛種で好ましいのは、バリウシ、コブウシ及びバフファロー雌牛又は雄牛である。

【0031】

一実施形態では動物細胞は脊椎動物海洋動物及び無脊椎動物海洋動物のような水生生物から単離される。より好ましいは水生生物は魚、両生類及び軟体動物からなる一群から選ぶ。魚としては制限なしで、縞模様の魚、鯉、鮭、カダヤシ、テンチ、ヤツメウナギ、丸ハゼ、テラピア及びマスが挙げられる。両生類としては制限なしで、ヒキガエルとカエルが挙げられる。軟体動物としては制限なしで、マガキ、カワホトトギスガイ、イガイダマシ、ニュージーランドキリガイダマシ、スクリミングカイ、アフリカンマイマイ及びビオンフェリア属とブリヌス属の病原媒介カタツムリが挙げられる。

【0032】

該発明コンストラクトの動物細胞への形質転換は、好ましくは相同組み替えによる。相同組み替え（分子遺伝学（Molecular Genetics）、ユー、メルチャー（U. Melcher (1998年）参照）は、好ましくは標的遺伝子含有組織培養液で成長した胚幹細胞のような細胞に遺伝子操作コンストラクトを添加して誘発される。より好ましくは形質転換幹細胞を新規胚盤胞に注入し、成熟動物に新規コンストラクトを固定させる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

ここに記載の出版物の全ては、出版物に報告され且つ該発明との関連で用いるかもしれないプロトコルと試薬の記載開示の目的で引用する。該発明がここで先行発明に基づいてこの開示に先行権付与を認可するものでは決してない。

10

20

30

40

50

【0034】

本発明の実施は他に示さない限り、技術の熟知範囲内の慣用分子生物学、植物生物学と動物生物学及び組み替えDNA技術を用いる。これらの技術は当業者には周知であり、文献に十分説明されている。例えばマニアチス (Maniatis)、フリッシュ (Fritsch)、サンプルック (Sambrook)、“分子クローニング、ラボラトリマニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)”、(1982年)；“DNAクローニング：実際的アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach)”、I巻及びII巻、(ディエヌ、グローバー編 (D.N. Glover, Ed.)、1985年)；“オリゴヌクレオチド合成 (Oligonucleotide Synthesis)”、(エムジェイ、ゲイト編 (M.J. Gait, Ed.)、1984年)；“核酸ハイブリッド形成 (Nucleic Acid Hybridization)”、(ビーディ、ハメス (B.D. Hames)、エスジェイ、ヒギンス編 (S.J. Higgins, eds.)、1985年)；“転写と翻訳 (Transcription and Translation)”、(ビーディ、ハメス (B.D. Hames)、エスジェイ、ヒギンス編 (S.J. Higgins, eds.)、1984年)；ビー、パーバル (P. Perbal)、“分子クローニングの実際的ガイド (A Practical Guide to Molecular Cloning)”、(1984年)及びサンプルック等 (Sambrook, et al.)、“分子クローニング；ラボラトリマニュアル (Molecular Cloning: a Laboratory Manual)”、12版、(1989年)参照。

【0035】

該発明は記載の特定材料と方法は限定されず、変わっても良いと理解される。又ここで用いる術語は特定の実施形態を記述する目的のためだけで、本発明の範囲を制限する意図はなく、その範囲は付随の特許請求の範囲にのみより限定されると理解する必要がある。ここと付随の特許請求の範囲で用いる“a”、“an”(「一つ」)及び“the”(「その」)と言う単数形は、別に明確に文脈が定めていない限り複数も含めて言及していることを知る必要がある。従って例えば“a plant cell”(「一つの植物細胞」)は複数のこの植物細胞を含み、“an animal cell”(「一つの動物細胞」)は一つ以上の動物細胞に関する。ここに記述のものと類似又は同等な任意の材料及び方法は本発明の実施又は試験に使用できるが、好ましい材料と方法を次いで説明する。

【0036】

本発明の最も広範囲な様態の一つでハイブリッドmRNA及び／又はハイブリッドタンパク質を形成する新規機構を記載する。ここに記載でより重要なのは、本発明で雑種強勢(HV)と雑種衰弱(HD^(C))現象を説明する機構の記述である。

【0037】

子孫がそのいずれかの親の同一の生物学的表現型の発現と比べて、いずれかの特定の生物学的表現型を増強型で示す場合にはHVが起こる。子孫がその親に比べていずれかの特定の生物学的表現型を低下型で示す場合にHD^(C)が起こる。

【0038】

HDの生物学的表現型は酵素のようなハイブリッドタンパク質活性の減少により直接引き起こされても良い。一方幾つかのハイブリッドタンパク質は免疫学的に異質と認識され、自己免疫プロセスを誘発してある形のHD開始を引き起こす。

【0039】

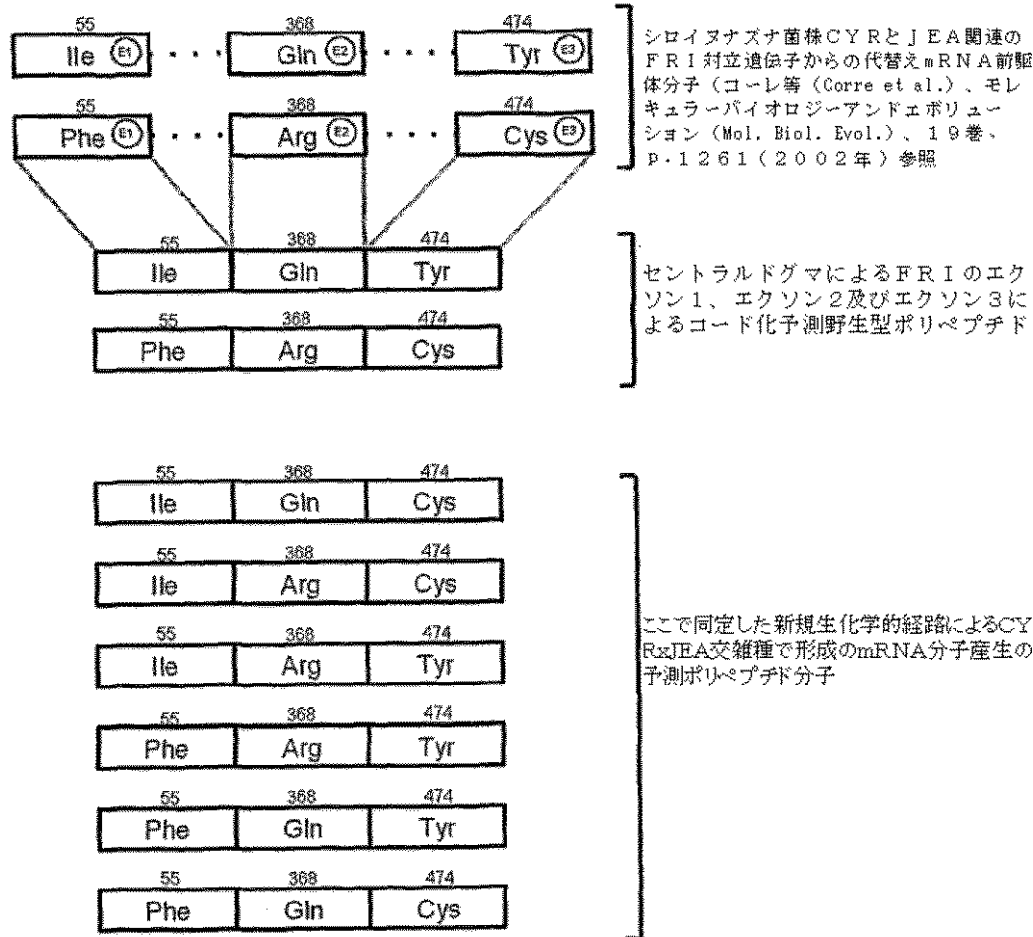
ここで用いた“ハイブリッドmRNA”及び“ハイブリッドタンパク質”と言う用語は、単一遺伝子の対立遺伝子の転写及び／又は翻訳時に産生する異種又は複数種のmRNA及び／又はタンパク質を意味する。

【0040】

ここに記載のハイブリッドmRNA分子のトランスエクソンアセンブリー機構による形成能を有するハイブリッドタンパク質範囲の例を図1に示す。シロイヌナズナ交雑種でのRFR Iコード化ハイブリッドタンパク質は、コーレ等 (Corre et al.)、(2002年)、モレキュラーバイオロジーアンドエボリューション (Mol. Biol. Evol.)、19巻、p. 1261に記載の代替FRI対立遺伝子のゲノム構造から推定した。

【0041】

シロイヌナズナ菌株CYRとJEA関連のFRI対立遺伝子のエクソン1、エクソン2及びエクソン3によるコード化野生型一次ペプチド及び潜在的ハイブリッド一次ペプチド



10

20

30

【0042】

E1、E2及びE3はそれぞれシロイヌナズナ遺伝子フリジダ（Frigida）内のエクソン1、エクソン2及びエクソン3を意味する。数字55、368及び474はそれぞれエクソン1、エクソン2及びエクソン3内のコード化変異アミノ酸の位置を意味する。各エクソンによりアミノ酸位55、368及び474で含まれるコード化アミノ酸変異体は従来の三文字表記で示される。CYR x JEA F1ハイブリッドで産生のハイブリッド一次ペプチド構造は、上記実験法により確証した生化学的経路を参考にして予測される。

【0043】

更に以下に説明するように一旦上記現象を当業者が認識し高く評価すると、多数の病状が治療でき、植物／動物が改良出来ることが容易に理解される。

40

【0044】

以下の説明では組み替えDNA技術で用いる多数の用語を利用する。別に定義しない限りここで用いる全ての科学技術用語は本発明が属する当事者が通常理解する意味を有する。以下の文献では本発明で用いる用語の多数の一般的定義が技術者に提供される。Singleton等（Singleton, et al.）、“微生物学と分子生物学辞書（Dictionary of Microbiology and Molecular Biology）”、（2版、1994年）；“ケンブリッジ科学技術辞書（The Cambridge Dictionary of Science and Technology）”、ウォーカー編（Walker, ed.）、1988年）；“遺伝学用語集（The Glossary of Genetics）”、5版、リーガー、アール等編（Rieger, R., et al.）、スプリングー出版（Springer Verlag）、（1991年）；及びヘール（Hale）、マーハム（Marham）、“ハーバーコリンズ生物学辞

50

書 (The Harper Collins Dictionary of Biology) ”、1991年。通常ここに記載の植物及び動物の維持管理と繁殖と同様に組み替えDNA技術での命名法と実験室手法は、技術的に周知で一般的に使用するものである。

【0045】

(定義)

“ポリヌクレオチド”、“ポリヌクレオチド配列”、“核酸配列”及び“核酸断片”／“単離核酸断片”と言う用語はここでは互換可能に用いる。これらの用語はヌクレオチド配列と類似体を包含する。ポリヌクレオチドは一本鎖又は二本鎖で、随意に合成ヌクレオチド塩基、非天然ヌクレオチド塩基又は変質ヌクレオチド塩基含有のRNA又はDNAポリマーでも良い。DNAポリマー型のポリヌクレオチドは、相補DNA、ゲノムDNA、合成DNA又はそれらの混合物の一つ以上のセグメントがなっても良い。

10

【0046】

RNAはmRNAでも良い。“mRNA”又は“伝令RNA”はDNAを転写し、鋳型として働きタンパク質のアミノ酸配列をコード化する一本鎖RNA分子である。

【0047】

“単離”ポリヌクレオチドと言う用語は、限定はしないが通常自然存在環境で見られるような単離ポリヌクレオチドを伴うか、又は相互作用する他染色体と染色体外DNAとRNAのような他の核酸配列が実質的に存在しないポリヌクレオチドを意味する。単離ポリヌクレオチドは天然に存在する宿主細胞から精製出来る。当業者には周知の在来の核酸精製法を用いて単離ポリヌクレオチドが得られる。この用語は又組み替えポリヌクレオチドと化学的合成ポリヌクレオチドも包含する。

20

【0048】

“組み替え”と言う用語は、例えば二つの別に分離した配列断片の人工的連結、例えば化学合成又は遺伝子工学技術による単離核酸の操作により核酸配列が作成されることを意味する。

【0049】

ここで用いる“実質的に類似の”とは、一つ以上のヌクレオチド塩基の変化がコード化アミノ酸に変化をもたらさないか、又は一つ以上のアミノ酸の置換がヌクレオチド配列によるコード化ポリペプチドの機能性に影響しない核酸分子を意味する。

【0050】

実質的に類似の核酸分子は又ハイブリッド形成能により特徴づけられる。この相同性の評価は、当業者が良く理解しているように、厳密な条件下でDNA-DNAハイブリッド形成又はDNA-RNAハイブリッド形成のいずれかにより与えられる(ハメス(Hames)、ヒギンス(Higgins)編、(1985年)、核酸ハイブリッド形成(Nucleic Acid Hybridization)、アイアールエル出版(IRL Press)、オックスフォード(Oxford)、英国(U.K.))。ハイブリッド形成後、洗浄により厳密条件が決定される。一組の好ましい条件は、室温で15分間、6xSSC、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で始まり、次いで45℃で30分間、2xSSC、0.5%SDSで間繰り返す、次いで50℃で30分間、0.2xSSC、0.5%SDSで二回繰り返す一連の洗浄を用いる。より好ましい厳密な条件の組み合わせでは、洗浄が最後の0.2xSSC、0.5%SDSによる二回の30分間洗浄温度を60℃に上昇する以外は上記と同じのより高い温度を使用する。他の非常に厳密な条件の組み合わせでは、最後の0.1xSSC、0.1%SDSによる二回洗浄に65℃を用いる。

30

40

【0051】

“合成遺伝子”又は“合成核酸断片”は、当業者に周知の手法を用いて化学的合成のオリゴヌクレオチドから構築できる。これらの構成要素は結紮徐冷してより大きな核酸分子を形成し、次いで酵素により組み立てて所望の全核酸分子を構築する。核酸断片に関連する“化学的合成の”とは、その成分ヌクレオチドをインビトロで組み立てることを意味する。核酸断片の手作業による化学合成は良く確立された手法を用いて得るか、又は自動的化学合成が多数の市販機械を用いて実行できる。それ故その核酸断片は宿主細胞のコドン

50

バイアスを反映するヌクレオチド配列最適化に基づく最適遺伝子に調整できる。当業者には使用コドンが宿主が好むコドンにバイアスした場合には、遺伝子発現の成功に有利なことが十分理解される。好ましいコドンは配列情報が利用できる宿主細胞由来遺伝子の調査に基づいて決定できる。

【0052】

“候補遺伝子の対立遺伝子”とは、候補遺伝子配列の正常対立遺伝子と同様に、個体に雑種強勢又は雑種衰弱を発生しやすくする変異体を保有する対立遺伝子を意味する。それ故ここで用いる“候補遺伝子配列”及び“候補遺伝子の対立遺伝子”という用語は、遺伝子配列、対立遺伝子又は領域を含むDNA、更にはこの遺伝子配列、対立遺伝子又は領域を含む一本鎖DNAのいずれか（即ちコード鎖及び非コード鎖のいずれか）を意味する。

10

【0053】

“候補遺伝子”又は“遺伝子”とは、雑種強勢又は雑種衰弱産生の可能性を有するコード配列前の制御配列（5'非コード配列）、その間の制御配列と、それに続く制御配列（3'非コード配列）を含む特定タンパク質を発現するmRNA断片のような核酸断片を意味する。“ネイティブ遺伝子”とは自身の制御配列を有する自然に見られる遺伝子を意味する。“キメラ遺伝子”又は“外来遺伝子”はここでは互換可能に用い、ネイティブ遺伝子ではなく、制御配列とコード配列が天然で一緒には見られない任意の遺伝子を意味する。それ故キメラ遺伝子又は外来遺伝子は、異なる起源由来の制御配列とコード配列を含むか、又は同じ起源由来だが天然に見られるものとは異なる形の配列の制御配列とコード配列でも良い。“内在遺伝子”とは生物ゲノムの自然位置にあるネイティブ遺伝子を意味する。“異質な遺伝子”とは宿主生物には通常見られないが、遺伝子移入による宿主生物へ導入される遺伝子を意味する。異質な遺伝子は非ネイティブ生物に挿入のネイティブ遺伝子、又はキメラ遺伝子を意味する。“導入遺伝子”は形質転換法でゲノムに導入された遺伝子である。

20

【0054】

“コード配列”は特異的アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を意味する。“アミノ酸配列の相同性”又は“アイデンティティ”という用語は、類似アミノ酸配列を有するタンパク質を意味する。技術者は重要なアミノ酸配列がタンパク質の機能ドメイン内にあることを認識する。従って相同タンパク質がアミノ酸配列の長さに対し40%以下の相同性を有するが、一つの機能ドメインでは90%以上の相同性を有することができる。

30

【0055】

アミノ酸はここではその通常周知の三文字表記又は国際純正応用化学連合一国際生化学連合生化学命名法委員会（IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission）推薦の一字文字表記を意味する。

【0056】

ヌクレオチドは同様にその通常容認されている一字コードを意味する。

【0057】

“保守的修飾変異体”はアミノ酸配列と核酸配列両者に適用される。特定の核酸配列に関する保守的修飾変異体は、同一又は実質的に同一のアミノ酸配列をコード化した核酸、又はその核酸がアミノ酸をコード化していない場合には実質的に同一の配列を意味する。

40

【0058】

遺伝暗号縮重のために多数の機能的に同一な核酸が任意の所定アミノ酸をコード化する。例えばコドンGCA、GCC、GCG及びGCU全てがアミノ酸アラニンをコード化する。従ってアラニンはコドンが指定する位置の全てで、コード化ポリペプチドを変更することなしにコドンは記載の対応コドンのいずれかに変更できる。この核酸変異体は“サイレント変異体”であり、保守的修飾変異体の一種である。ここでポリペプチドコード化核酸配列の全ては、又核酸の可能なサイレント変異体の全てを記述する。技術者は核酸の各コドン（通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUG以外）は、修飾して機能的に同一分子を産生できる。それ故ポリペプチドコード化核酸の各サイレント変異体が各記載配列で暗示される。

50

【0059】

アミノ酸配列に関して技術者は“保守的修飾変異体”が化学的類似アミノ酸によるアミノ酸置換で生ずるコード配列への変化で生じことが分かる。機能的に類似なアミノ酸を与える同類置換表は技術的に周知である。

【0060】

以下の六つのグループはそれぞれ互いに同類置換のアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、スレオニン (T)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) 及び
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

(例えばクレイトン (Creighton)、タンパク質 (Proteins)、(1984年) 参照)。

【0061】

“非保守的修飾変異体”という用語は同類置換を含まないアミノ酸変異を意味する。例えばフェニルアラニンのアラニン置換は非保守的終章変異体を構成するであろう。

【0062】

“制御配列”とはコード配列上流 (5' 非コード配列)、コード配列内、又はコード配列下流 (3' 非コード配列) に位置し、関連コード配列の転写、RNA プロセッシング又は RNA 安定性、又は翻訳に影響するヌクレオチド配列を意味する。制御配列はプロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列及びスプライス部位選択に影響する配列を含んでも良い。

【0063】

“プロモーター”とはコード配列又は機能性 RNA 発現を制御できるヌクレオチド配列を意味する。通常コード配列はプロモーター配列の 3' 位に位置する。プロモーター配列は近位エレメントとより遠位な上流エレメントを含み、後者エレメントはしばしばエンハンサーエレメントと呼ばれる。それ故“エンハンサー”はプロモーター活性を刺激するヌクレオチド配列であり、且つプロモーターの先天性エレメントか又はプロモーターレベル又はプロモーターの組織特異性を増強するために挿入の異種エレメントでも良い。プロモーターはその全体がネイティブ遺伝子由来でも良く、自然に見られる異なるプロモーター由来の異なるエレメントからなっても良く、合成ヌクレオチドセグメントでさえも含まれる。異なるプロモーターが、異なる組織又は細胞型、異なる発生段階、又は異なる環境条件に応じて遺伝子発現を命令することは当業者には理解される。核酸断片を最も多くの細胞型で最も多くの時に発現させるプロモーターは、通常“構成プロモーター”と呼ばれる。

【0064】

“翻訳リーダー配列”とは、遺伝子のプロモーター配列とコード配列間に位置するヌクレオチド配列を意味する。翻訳リーダー配列は翻訳開始配列上流の完全処理 mRNA に存在する。翻訳リーダー配列は mRNA への一次転写物のプロセッシング、mRNA 安定性又は翻訳効率に影響する。翻訳リーダー配列の例としては、ターナー (Turner)、フォスター (Foster)、(1995年)、モレキュラーバイオテクノロジー (Mol. Biotechnol.)、3 巻、p. 225-236 に記載されている。“3' 非コード配列”とはコード配列下流に位置するヌクレオチド配列を意味し、ポリアデニル化認識配列と mRNA プロセッシング又は遺伝子発現に影響できる制御シグナルをコード化する他配列を含む。ポリアデニル化シグナルは通常ポリアデニル酸路の mRNA 前駆体の 3' 末端への付加に影響する特徴を持つ。異なる 3' 非コード配列の使用はインゲルブレヒト等 (Ingelbrecht et al.)、(1989年)、プラントセル (Plant Cell)、1 巻、p. 671-680 により例示された。

【0065】

“RNA 転写物”とは DNA 配列の RNA ポリメラーゼ触媒転写で生ずる産生物を意味

する。RNA転写物がDNA配列の完全相補コピーの場合には、それはその一次転写物を意味するか、又は一次転写物の転写後プロセシング由来のRNA配列の場合には、成熟RNAと呼ばれる。“伝令RNA (mRNA)”とはイントロがなく、細胞によりポリペプチドに翻訳できるRNAを意味する。“相補DNA”とはmRNA鋳型に相補で且つmRNA鋳型に由来するDNAを意味する。相補DNAは一本鎖型でも、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ (Klenow) 断片を用いて二本鎖型に変換出来る。“センスRNA”とはmRNA含有のRNA転写物を意味し、それ故細胞によりポリペプチドに翻訳できる。“機能性RNA”とはセンスRNA、アンチセンスRNA、リボザイムRNA、又は翻訳はされないが細胞プロセスに影響する他のRNAを意味する。

【0066】

“操作可能に連結する”という用語は、単一ポリヌクレオチドの二つ以上の核酸の一つの機能が他により影響されるように、二つ以上の核酸の連結を意味する。例えばプロモーターはコード配列の発現に影響できる場合には、プロモーターはコード配列と操作可能に連結する（即ちコード配列がプロモーターの転写制御を受けている）。コード配列はセンス配向又はアンチセンス配向で制御配列と操作可能に連結する。

【0067】

ここでも用いる“発現”という用語は、該発明の核酸断片由来センス (mRNA) の転写と安定な蓄積を意味する。発現は又ポリヌクレオチドへのmRNA翻訳を意味する。

【0068】

“タンパク質”又は“ポリペプチド”は、ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドコード配列が決定した特異的順序に配列のアミノ酸鎖である。各タンパク質又はポリペプチドは独自の機能を有する。

【0069】

“変化レベル”又は“変化発現”とは、形質転換体での正常生物又は非形質転換生物とは異なる量又は割合の一つ又は複数の遺伝子産物の産生を意味する。

【0070】

“成熟タンパク質”又は“成熟”という用語をタンパク質記述に用いた場合には、翻訳後プロセシングポリペプチド、即ち一次翻訳産物に存在する任意のプリペプチド又はプロペプチドが除去されたポリペプチドを意味する。“前駆体タンパク質”又は“前駆体”という用語がタンパク質記述に用いた場合には、mRNA翻訳の一次産物、即ちプリペプチド又はプロペプチドがなお存在する一次産物を意味する。プリペプチドとプロペプチドは細胞内移行シグナルでも良いが、限定はされない。

【0071】

“形質転換”とは宿主生物ゲノムへの核酸断片を転移し、遺伝学的に安定な遺伝を意味する。形質転換した核酸断片含有宿主生物は、“形質転換”体と呼ばれる。植物形質転換法の例としては、アグロバクテリウム仲介形質転換 (ドゥブラレ等 (De Blaere et al.)、(1987年)、メソッドオブエンザイモモロジー (Meth. Enzymol.)、143巻、p. 277)、相同的組み替え及び粒子加速又は“遺伝子銃”形質転換技術 (ここに文献として組み入れたクライン等 (Klein et al.)、(1987年)、ネーチャー (ロンドン) (Nature (London))、327巻、p. 70-73; 米国特許第4945050号) が挙げられる。従って本発明の単離ポリヌクレオチドは宿主細胞に導入複製可能な組み換えコンストラクト、通常DNAコンストラクトに組み入れることができる。このコンストラクトは一つの複製システムと、所定宿主細胞でポリペプチドコード化配列の転写翻訳が可能な配列を含むベクターであり得る。植物細胞の安定な形質移入、又は形質転換植物の確立に適した多数のベクターは、例えばポウエル等 (Pouwels et al.)、ベクターのクローニング: ラボラトリマニュアル (Cloning Vectors: A Laboratory Manual)、1985年、補刊、p. 1987; ワイスバッハ (Weissbach)、ワイスバッハ (Weissbach)、植物分子生物学の方法 (Methods for Plant Molecular Biology)、アカデミックプレス (Academic Press)、1989年; 及びフレビン等 (Flevin et al.)、植物分子生物学マニュアル (Plant Molecular Biology Manual)、クルーワーアカデミック出版社 (Kluwer Academic Publishers) によって提供される。

10

20

30

40

50

mic Publishers)、1990年に記載されている。通常植物発現ベクターとしては、例えば5'制御配列と3'制御配列の転写制御下での一つ以上のクローン植物遺伝子と支配的な選択可能マーカーが挙げられる。この植物発現ベクターとしては、又プロモーター調節領域（例えば誘導性又は構成的発現、環境的又は発生制御的発現、又は細胞特異的又は組織特異的発現）、転写開始部位、リボソーム結合部位、RNAプロセシングシグナル、転写終結部位及び／又はポリアデニル化シグナルが挙げられる。

【0072】

“PCR”又は“ポリメラーゼ連鎖反応”は、特異的DNAセグメント増幅に用いる技術として当業者には周知である（米国特許第4683195号及び米国特許第4800159号）。

10

【0073】

“子孫”と言う用語は、一つの特定親植物又は一組の親植物由来の種及びそれからの植物を含む任意の後続世代を意味する。

【0074】

“再生”は植物細胞（例えば植物プロトプラスト又は外植体）からの植物成長工程である。

【0075】

“選択DNA”は宿主ゲノムに導入したDNAセグメントである。好ましい選択DNAとしては、一つ以上の外来遺伝子と宿主細胞で外来遺伝子を発現するエレメント、例えば一つのプロモーターと一つのターミネーターが挙げられる。選択DNAを有する一つ以上のエンハンサー含有により利益が実現できる。

20

【0076】

“形質転換細胞”は細胞への外来DNA分子導入によりDNAが変化した細胞である。

【0077】

“形質転換植物”は、植物DNAが同一系統のネイティブの非形質転換植物には始めに存在しなかった導入外来DNA分子を含有する形質転換植物細胞又はプロトプラストの植物、又はそれから誘導の任意の後続世代の子孫である。形質転換植物は更に形質転換された植物に生来のものであるが、元の又は野生型遺伝子産物の構造、又はその遺伝子の発現レベル又はパターンを変えるために“外来”遺伝子が遺伝子技術手段により変化した配列を含んでも良い。

30

【0078】

“ベクター”は宿主細胞で複製でき、及び／又は他のDNAセグメントが付着セグメントの複製が起こるように操作可能に連結できるDNA分子である。プラスミドは典型的ベクター又は新規遺伝子を細胞に運ぶのに用いるDNA分子である。プラスミドはDNAの独立の安定な自己複製断片の典型的ベクターである。

【0079】

ここで用いた“遺伝子型”と言う用語は、各細胞、細胞培養液、植物又は動物の遺伝構成である。

【0080】

ここで用いた“ヘテロ接合体”と言う用語は、少なくとも一つの座位に異なる対立遺伝子（所定遺伝子形態）を有する二倍体又は倍数体の各細胞、植物又は動物を意味する。

40

【0081】

ここで用いた“ヘテロ接合性の”と言う用語は、特定の遺伝子座位に異なる対立遺伝子（所定遺伝子形態）の存在を意味する。

【0082】

ここで用いる“ホモ接合体”と言う用語は、一つ以上の座位に同一対立遺伝子を有する各細胞又は植物を意味する。

【0083】

ここで用いた“ホモ接合性の”と言う用語は、相同染色体セグメントの一つ以上の座位に同一対立遺伝子の存在を意味する。

50

【0084】

該明細書全体を通して“含む”及び“含んでいる”及び“含む（単数での使用）”のようなこの単語の変形は“制限なしに含む”を意味し、他の添加物類、成分類、整数類又は手段類を除外する意図はない。“からなる”とは、制限なしでこの成句“からなる”に続くものは何でも含むことを意味する。従って“からなる”と言う成句は列挙要素が必要又は必須であり、他の要素は存在しないことを指示する。“本質的にからなる”とは、成句に続いて任意の列挙要素と、列挙要素の開示で指定した活動又は行動を妨害しないか、又は寄与しない他要素に限定する要素を含むことを意味する。従って“本質的にからなる”と言う成句は列挙要素が必要又は必須であるが、他要素は随意ではなく、且つ列挙要素の活動又は行動に影響するかしないかにより他要素が存在するかしないことを指示する。

10

【0085】

実験プロトコル

本発明の最も広範囲な様態の一つで、雑種強勢又は雑種衰弱をもたらす因子類の同定法を提供する。ここで用いた“因子類”と言う用語は、ここで定義する直接又は間接的に雑種強勢又は雑種衰弱をもたらす候補遺伝子の対立遺伝子による複数種のコード化mRNA又はタンパク質の存在を意味する。この因子類は一つ以上種のmRNA又はタンパク質が直接存在する結果でも良い。代わりに因子類は複数種のmRNA又はタンパク質が間接的に存在する結果でも良い。

【0086】

他の場所で検討するように該発明者は雑種強勢又は雑種衰弱が一つ以上種の“ハイブリッド”mRNA又はタンパク質の存在で生じると考える。これらのハイブリッドmRNA種又はハイブリッドタンパク質種は標準法を用いて同定できる。例えば異なるmRNA種がSSCP（一本鎖高次構造多型分析法）又はDHPLC（変性剤高速液体クロマトグラフィ法）のような技法を用いて同定できる。例えば米国特許第5795976号及び米国特許第6453244号参照。

20

【0087】

多種のタンパク質の存在は等電点電気泳動法でも同定できるであろう。各mRNAのそれぞれをクローンし、標準的配列決定法を用いて配列決定出来るであろう。各タンパク質も又配列決定出来るであろう。これらの方法全ては標準的技術を用いるであろう。

【0088】

一旦多種のmRNA又はタンパク質が動物又は植物に存在することが同定されると、ハイブリッドmRNA及び／又はハイブリッドタンパク質に関与する候補遺伝子を同定出来るであろう。

30

【0089】

以前に定義したように“候補遺伝子”と言う用語は、雑種強勢又は雑種衰弱產生の可能性を有するmRNA断片のような核酸断片を意味する。ここで用いた“雑種強勢”又は“ヘテロシス”と言う用語は互換可能であり、純血種の性能を超えるハイブリッドの性能、最も顕著には成長速度、繁殖性及び耐病性のような形質での増加を意味する。特に候補遺伝子は、一つの動物又は植物でヘテロ接合で且つ機能性であり、雑種強勢をもたらす遺伝子である。一実施形態では各遺伝子の対立遺伝子は、変異体がアミノ酸配列変異体をもたらすコード配列の異なるエクソンにヌクレオチド配列変異体を含む。例えば植物又は動物が遺伝子Xの二つの対立遺伝子、即ち遺伝子Xのヘテロ接合体を含む場合には、本発明の候補遺伝子としての第一必要条件を満たす。第二の基準は変異が任意の発現タンパク質にアミノ酸配列変異体をもたらすヌクレオチド配列での配列変異であろう。第三の基準は各対立遺伝子が、配列変異が各対立遺伝子の同一位置に見られない配列変異体を含むことであろう。例えば上記遺伝子Xで各対立遺伝子は、対立遺伝子1では変異は1位であるが、対立遺伝子2では変異は20位である配列変異体を含む。変異がアミノ酸配列の変化をもたらす場合には、これは第二基準と第三基準を満たすであろう。第四の基準は変異が単に同一エクソンの異なる位置であるよりむしろ異なるエクソンで現れる変異体であろう。

40

【0090】

50

一実施形態では候補遺伝子は、変異が異なる対立遺伝子の異なるエクソンに見られるアミノ酸変異体をコードする一つ以上のヌクレオチド配列変異体を有するであろう。

【0091】

候補遺伝子は好ましくは少なくとも三種のmRNAを産生するであろう。それらは一つの対立遺伝子と同一の一つのmRNA分子、第二対立遺伝子のコード配列と同一のmRNA分子、及び両対立遺伝子のエクソンの組み合わせ含むハイブリッドmRNA分子である。明らかにエクソンの数により異種のハイブリッドmRNA分子の数は非常に多いであろう。

【0092】

候補遺伝子同定法は比較的簡単である。これらは常法の配列解析又は候補遺伝子のPCR増幅配列のサザンブロット解析により同定出来るであろう（例えばギーセルマン等（Gieselmann et al.）、（1989年）、プロシーディングオブナショナルアカデミーオブサイエンス、ユーエスエイ（Proc. Natl. Acad. Sci.）、86巻、p. 9436-9440参照）。均一管及び／又は閉管で増幅の検出は技術的に多くの手段を用いて、例えばPCR反応でのタクマン（登録商標）（TaqMan）ハイブリッド形成プローブと、一旦十分に増幅が起こると標的核酸に特異的な蛍光測定を用いて実施出来ることは当事者には良く理解できる。しかしロッシュライトサイクラー（登録商標）（Roche Lightcycler）の性質と速度から、好ましい方法はリアルタイムPCRで蛍光標識ハイブリッド形成オリゴヌクレオチドを用いてロッシュライトサイクラー（登録商標）（Roche Lightcycler）で融解曲線解析を用いることによる。

【0093】

タクマン（登録商標）（Taqman）法の基づくもの（米国特許第5538848号及び米国特許第5691146号）、蛍光偏光測定法（例えばギブソン等（Gibson et al.）、クリニカルケミストリー（Clin. Chem.）、1997年、43巻、p. 1336-1341）及びインベダー（Invader）アッセイ（例えばアガラワル、ピー等（Agarwal P. et al.）、ダイアグノスティックモレキュラーパソロジー（Diagn. Mol. Pathol.）、2000年9月、9巻（3号）、p. 158-164；ライアン、ディ等（Ryan, D. et al.）、モレキュラーダイアグノシス（Mol. Diagn.）、1999年6月、4巻（2号）、p. 135-144）のような類似の他の定量的“リアルタイム”で均一な核酸増幅／検出システムが当業者には知られている。これらのシステムは又記載の該発明での使用に適用でき、適切にデザインされると遺伝子の突然変異と多型検出での核酸増幅と対立遺伝子識別をリアルタイムで監視できる。

【0094】

一旦候補遺伝子を同定すると、次いで該発明の他様態に使用するために単離又は合成的に産生できる。例えば雑種強勢産生の疑いのある候補遺伝子が、宿主細胞（植物又は動物）に形質転換し、形質転換植物又は形質転換動物が再生できるであろう。

【0095】

形質転換動物産生法は、通常（1）細胞核ゲノムへの特異的DNA配列挿入に利用できる適切DNAコンストラクトを組み立て、（2）細胞にそのDNAコンストラクトを形質移入し、（3）無作為挿入及び／又は相同組み替えを起こさせる段階を含む。このプロセスで生ずる修飾は、標的ゲノムへの一つ又は複数の適切なDNAコンストラクトの挿入、標的ゲノムからのDNA削除、及び／又は標的ゲノムの突然変異である。

【0096】

DNAコンストラクトは興味の遺伝子で、例えば異なるエクソンが異なる配列と同様に、制御プロモーター、インスレーター、エンハンサー及びレプレッサーを含む種々のエレメント、更にはDNAコンストラクトの転写RNAとのリボソーム結合でのエレメントを含む異なる対立遺伝子で採取のエクソンを含む合成遺伝子を含むことができる。これらの例は当業者には周知であり、制限を意味するものではない。

【0097】

データベースと商業部門で容易に利用可能な制御エレメントと遺伝子に関するDNA配

10

20

30

40

50

列と併せて利用可能な有用な組み替えDNA技術により、技術の通常技術者はここに記載の材料と方法を用いて形質転換動物細胞構築に適切なDNAコンストラクトを容易に産生できる。

【0098】

例えば候補遺伝子に関する全ヌクレオチドコード配列が、例えばDNA配列決定解析又は制限酵素解析による決定で単一相補DNA、ゲノムDNA又は他のDNAで得られない場合には、適切なDNA断片（例えば制限酵素断片又はPCR増幅産物）を幾つかのDNAから回収し、互いに共有結合で接合して全コード配列を組み立てても良い。DNA断片の共有結合による好ましい接合法は、T4DNAリガーゼのようなDNAリガーゼ酵素を用いる結紮による。次いで単離候補遺伝子をプラスミド又は発現ベクターに組み入れ得る。

10

【0099】

動物細胞への形質移入技術は技術の通常技術者には周知であり、動物細胞へのDNAコンストラクトの形質移入を実施する材料と方法は市販されている。動物細胞へのDNAコンストラクトの形質移入に通常用いる材料は、例えばリポフェクチン^(TM) (Lipofectin) のように脂肪親和性化合物である。特定の脂肪親和性化合物を誘導して細胞へのDNAコンストラクトの形質移入を仲介するリボソームが形成できる。

【0100】

DNAコンストラクトの標的配列は合理的なDNAコンストラクトデザインにより核ゲノムの特異的領域に挿入できる。これらのデザイン技術は当業者には周知である。例えばここに全て文献として組み入れた米国特許第5633067号、米国特許第5612205号及び国際公開WO93/22432号参照。一旦所望DNA配列が核ゲノムに挿入されると、挿入領域の場所と同様に所望DNA配列が核ゲノムに挿入される頻度は当業者に周知の方法で同定できる。

20

【0101】

一旦導入遺伝子がドナー細胞の核ゲノムに挿入されると、その細胞は該発明の他のドナー細胞のように核移植法の核ドナーとして使用できる。卵母細胞への細胞核移植法は好ましくは再構成細胞が形成出来る細胞融合を含む。

【0102】

融合は通常接触／融合面に直流(DC)電気パルス印加して誘発するが、追加の交流(AC)電流を用いてドナー細胞とレシピエント細胞の整列化を助けても良い。電気融合により原形質膜の一過的破壊を起すが、その膜の迅速な再編成に十分短い電気パルスを生ずる。従って二つの隣接膜の破壊が誘発され再編成で脂質二重層が混ざると、その二つの細胞間に小さいチャンネルが開く。この小さい開口部の熱力学的不安定性により、二つの細胞が一つになるまで開口部は拡大する。この過程の更なる検討に関する文献としては、プラサー等(Prather et al.)の米国特許第4997384号がある(ここに全体を文献として取り入れている)。種々の電気融合培地、例えばショ糖、マンニトール、ソルビトール及びリン酸緩衝液を含む培地が使用できる。

30

【0103】

又融合は膜融合剤としてセンダイウイルスを用いても達成できる(グラハム(Graham)、ウイスターインスティテュートシンポジウムモノグラフ(Wister Inst. Symp. Monogr.、9巻、p. 19、1969年)。融合は又ポリエチレングリコールのような融合促進試薬への細胞暴露によっても誘発できる。

40

【0104】

好ましくはドナー動物細胞と卵母細胞を500µm融合チャンバーに入れ、26℃-27℃の融合培地(0.3Mマンニトール、0.1mM硫酸マグネシウム、0.05mM塩化カルシウム)4mlでカバーする。次いで70-100Vの直流重畳直流(DC)電気パルスを約15µs、約1秒間隔で印加して電気融合する。次いで融合後生成した融合再編成細胞を活性化されるまで適切な培地、例えば組織培養培地(TCM)-199培地に入れる。

50

【0105】

細胞融合の好ましい方法ではドナー動物細胞を先ず除核卵母細胞に付着する。例えば動物細胞を除核卵母細胞に付着し、この動物細胞と除核卵母細胞膜が融合できる化合物を選ぶ。この化合物としては細胞を凝集出来る任意の化合物である。その化合物は炭水化物と結合又は凝集出来るタンパク質又は糖タンパク質でも良い。より好ましい化合物はレクチンである。このレクチンとしてはコンカナバリンA、カナバリンA、リシン、大豆レクチン、ハスの種レクチン及び植物性血球凝集素（PHA）を含む一群から選んでも良い。好ましくはその化合物はPHAである。

【0106】

好ましい一実施形態では、上に記載の電気融合法は又追加の融合段階を含むか、又は上に記載の融合段階が一つのドナー動物細胞と二つ以上の除核卵母細胞を含む。二重融合法は再編成細胞の細胞質体積増加に有効な効果を有する。

【0107】

再編成動物細胞は通常核ドナーとレシピエント卵母細胞の融合前、融合間及び融合後に電気法及び／又は非電気法により活性化される（例えばサスコパリッシュ等（Susko-Parrish, et al.）、米国特許第5496720号参照）。活性化法としては以下が挙げられる。

- 1) 電気パルス；
- 2) 化学誘導ショック；
- 3) 精子の侵入；
- 4) 卵母細胞原形質への二価カチオン、例えばマグネシウム、ストロンチウム、バリウム又はカルシウムの、例えばイオン透過孔型で導入による卵母細胞中の二価カチオンレベルの増加。二価カチオンレベル増加の他法としては、電気ショック、エタノール処理及びかご入りキレート化剤の使用が挙げられ、且つ
- 5) 周知の方法、例えばキナーゼ阻害剤、例えば6-ジメチルアミノプリン、スタウロsporin、2-アミノプリン及びスイフィンゴシンのようなセリンスレオニンキナーゼ阻害剤の添加による卵母細胞中の細胞タンパク質のリン酸化の減少。代わりに細胞タンパク質のリン酸化は卵母細胞へのホスファターゼ、例えばホスファターゼ2A及びホスファターゼ2Bの導入により阻害しても良い。

【0108】

活性化再編成動物細胞又は胚は通常技術の通常技術者には周知の培地で培養され、制限なしでTCM-199プラス10%ウシ胎児血清（FCS）、タイロドーアルブミン-乳酸-ピルビン酸（TALP）、ハムF-10プラス10%FCS、合成卵管液（“SOF”）、B2、CR1aa、中カリウムシンプレックス培地及び高カリウムシンプレックス培地（“KSOM”）が挙げられる。

【0109】

再編成細胞は又周知の方法で活性化しても良い。この方法としては、例えば実質的にこの再編成細胞に冷ショック又は実際に低温ショックを加える。再編成細胞の生理温度以下温度での培養が挙げられる。これを最も便利に行うには、再編成動物細胞を胚が通常暴露される生理温度条件に比べ冷たい室温で培養する。適切な卵母細胞活性化法は、ここに全体を文献として組み入れたサスコパリッシュ等（Susko-Parrish et al.）の米国特許第5496720号の主題である。

【0110】

次いで活性化再編成動物細胞を細胞類及び細胞群体類産生まで適切なインビトロ培地で培養できる。動物胚の培養成熟に適する培地は技術的に周知である。ウシ胚の培養維持に用いられる培地としては、ハムF-10プラス10%FCS、TCM-199プラス10%FCS、タイロドーアルブミン-乳酸-ピルビン酸（TALP）、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、イーグルウィッテン培地が挙げられる。卵母細胞の回収成熟に使用される最も普通の培地の一つは、TCM-199と、ウシ胎仔血清、新生仔血清、発情期乳牛血清、子羊血清又は去勢ウシ血清を含む1-20%血清サプリメントである

10

20

30

40

50

。好ましい維持培地としては、アール塩を有するTCM-199、10%FCS、0.2mMピルビン酸ナトリウム及び50μg/mlの硫酸ゲンタマイシンが挙げられる。又上記のいずれも顆粒膜細胞、卵管細胞、ラット肝由来(BRL)細胞及び子宮細胞、及びマウス胎仔線維芽細胞芽(STO)細胞のような種々の細胞型との共培養が挙げられる。

【0111】

この培養した再編成動物細胞又は胚は好ましくは後で洗浄後、適切培地、例えば好ましくは適切な周密支持細胞層含有の穴プレートに含まれる10%FCS含有TCM-199培地に入れる。適切な支持細胞層としては、一例として線維芽細胞と上皮細胞、例えば有蹄動物由来の線維芽細胞と子宮上皮細胞、ニワトリ線維芽細胞、ネズミ(例えばマウス又はラット)線維芽細胞、STOとSI-m220支持株細胞株及びBRL細胞が挙げられる。

10

【0112】

一実施形態では支持細胞はマウス胎仔線維芽細胞を含む。適切な線維芽細胞支持細胞層の調製は技術的に周知である。

【0113】

再編成動物細胞はその再編成細胞が雌レシピエントへの移植か、又は細胞又は細胞群体産生に使用できる細胞獲得に適する大きさに達するまで支持細胞層で培養する。好ましくはこれらの再編成細胞は少なくとも約2乃至400個の細胞、より好ましくは約4乃至128個の細胞、最も好ましくは少なくとも約50個の細胞まで培養する。培養は適切な条件下、即ち約39℃、5%炭酸ガス下で、成長最適化のために培地を通常約2-5日毎、

20

【0114】

本発明の胚移植法とレシピエント動物管理法は、胚移植産業で用いる標準的方法である。同時移植は本発明が成功するのに重要で、即ち核移植胚が雌レシピエントの発情周期と同期する。この利点と如何にレシピエントを維持するかについては、シーデル、ジュニア(J. Siedel, G.E. Jr.) (“牛胚移植法の批判的総説(Critical review of embryo transfer procedures with cattle)”)、エル、マストロイアンニ、ジュニア(L. Mastroianni, Jr.)、ジェイディ、ビッグズ(J.D. Biggers)編、インビトロの受精と胚発生(Fertilization and Embryonic Development in Vitro)、プレナムプレス(Plenum Press)、ニューヨーク(New York)、ニューヨーク州(N.Y.)、p. 323により

30

【0115】

簡潔には胚盤胞は同期化レシピエントの子宮に非外科的か外科的に移植できる。又当業者に周知の技術と培地を用いて他の培地も使用できる。一方法ではクローン胚を新鮮なKSOMで三回洗浄し、5%炭酸ガス、5%酸素及び90%窒素下、39℃で0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を有するKSOM中で4日間培養し、次いで1%BSAを有するKSOMで更に3日間培養する。胚発生を技術的に既知の標準的方法で検査し格付けする。切断率を二日目に記録し、切断胚を更に7日間培養する。7日目に胚盤胞発生を記録し、胚及び/又は動物利用の可能性を待って一つ又は二つの胚を各同期化乳母の子宮に非外科的に移植する。

40

【0116】

乳母は好ましくは妊娠期間の40日目、60日目、90日目及び120日目のように定期的に直腸触診又は超音波診断により妊娠を調べる。好ましくは妊娠期間の種々の段階での胚損失を評価するために、妊娠中綿密な所見と継続的超音波モニター(毎月)を行う。流産胎仔のいずれについて可能ならば、クローン状態と確認のためのDNA分類と同様に定常的病理学検査のために回収する。

【0117】

再編成動物細胞、活性化再編成動物細胞、この方法段階で産生される胎仔及び動物及びそれらから回収できる細胞、核及び他の細胞成分は又本発明実施形態であることを主張する。産生動物と言う用語が生存動物であることが特に好ましい。

50

【0118】

本発明は又例えば細胞、組織及び器官移植に使用できる胚類、胎仔類又は子孫産生に使用できる。胎仔細胞又は成人細胞を動物から採取しそれをクローニング法に用いて、種々の細胞類、組織類及び多分器官類がクローン胎仔が臓器形成により発生して得られる。細胞類、組織類及び器官類が同様にクローン子孫から単離出来る。このプロセスにより細胞治療と遺伝子治療を含む多くの医学療法と動物治療用の“材料類”供給源が提供される。細胞が誘導された動物にその細胞を移植し戻すと、免疫拒絶が防げる。又多くの細胞型がこれらクローンから単離出来るので、造血キメラ現象のような他の手順を用いて、同種と同様に種間の動物での免疫拒絶を避けられる。

【0119】

一実施形態では候補遺伝子は上に検討したように雑種強勢を産生できる植物遺伝子である。

【0120】

従来は雑種植物は一つの優良純系植物を一つ以上の他の遺伝学的に異なり多様な純系植物と交雑して偶発的な事象により産生する。交雑は一つの優良純系植物の花粉を採取し、他の優良純系植物に移植することからなる。二つの純系交雑による種は第一世代雑種であり、 F_1 と呼ばれる。商業的に有益な純系類はその親のいずれよりもより良い収率、立木性及び他の重要特性を有する。

【0121】

本発明で一旦候補遺伝子が同定されると、候補遺伝子が単離又は合成されて発現ベクターにサブクローニングするか、又はレシピエント植物に直接形質転換する。

【0122】

DNAセグメントの細胞への形質転換法は多くあるが、その全てが植物細胞のDNAへの送達に適するわけではない。現発明で用いる適切法は、プロトプラストのPEG仲介形質転換（オミルレー等（Omirulleh, et al.）、1993年）によるようなDNAの直接送達、メガヌクレアーゼ1-Scel使用のようなメガヌクレアーゼ利用遺伝子組換え（<http://www.collectis.com>参照）の使用、電気穿孔法（ここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5384253号）、炭化ケイ素繊維との攪拌（ここに全体を文献として具体的に組み入れたケップラー等（Kaeppler, et al.）、1990年、米国特許第5302523号及びここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5464765号）、アグロバクテリウム仲介形質転換（両者ともここに文献として具体的に組み入れた米国特許第5591616号及び米国特許第5563055号）及びDNA塗布粒子の加速（いずれもここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5550318号、米国特許第5538877号及び米国特許第5538880号）によるDNAを細胞に導入できるいずれかの方法が事実上含まれると考えられる。これらの技術の適用により植物細胞は安定に形質転換でき、これらの細胞は形質転換植物に進化する。ある実施形態では加速法が好まれ、例えば微粒子銃法や類似法が挙げられる。

【0123】

電気穿孔法ではDNAを導入したい場合には、クリジゼック等（Krzyzek et al.）の方法（ここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5384253号）が特に有益であると考えられる。この方法ではペクチン分解酵素のような特定細胞壁分解酵素を用いて、標的レシピエント細胞を未処理細胞に比べて電気穿孔により、より形質転換され易くする。代わりに機械的創傷により、より形質転換され易くする。

【0124】

電気穿孔により形質転換を達成するには、細胞又は胚形成カルスの懸濁培養液のような脆弱な組織を用いるか、代わりに未熟胚又は他の器質化組織を直接形質転換できる。この技法では選択細胞の細胞壁をペクチン分解酵素（ペクトリアーゼ）に暴露するか、又は制御した形で機械的に傷つけて部分的に分解するであろう。無傷細胞の電気穿孔により形質転換された幾つかの種の例としては、トウモロコシ（米国特許第5384253号；ドゥハルイン等（D'Halluin et al.）、1992年；ローデス等（Rhodes et al.）、199

10

20

30

40

50

5年)、小麦(ゾー等(Zhou et al.)、1993年)、トマト(ホー(Hou)、リン(Lin)、1996年)、大豆(クリストー等(Christou et al.)、1987年)及びたばこ(リー等(Lee et al.)、1989年)が挙げられる。

【0125】

又植物類の電気穿孔形質転換にプロトプラストを用いても良い(ベーツ(Bates)、1994年;ラッゼリ(Lazzeri)、1995年)。例えば子葉由来プロトプラストの電気穿孔による遺伝子組換え大豆植物の産生が、ディール(Dhir)、ウイドホルム(Widholm)の国際公開WO92/17598号(ここに具体的に文献として組み入れてある)に記載されている。プロトプラストの形質転換が記載されている種他例としては、大麦(ラッゼリ(Lazzeri)、1995年)、サトウモロコシ(バットロウ等(Battraw et al.)、1991年)、トウモロコシ(バッタチャジー等(Bhattacharjee et al.)、1997年)、小麦(ヘー等(He et al.)、1994年)、トマト(ツカダ(Tsukada)、1989年)及び大豆(ディール(Dhir)、1992年)が挙げられる。

【0126】

該発明に基づく植物細胞への候補遺伝子DNAセグメントの形質転換送達に好ましい方法は、微粒子銃法である(いずれもここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5550318号、米国特許第5538880号、米国特許第5610042号及び国際公開WO94/09699号)。本法では粒子を核酸で塗布し、推進力により細胞内に送達する。代表的粒子としてはタングステン、白金及び好ましくは金からなる粒子である。ある場合には微粒子銃法を用いるレシピエント細胞へのDNA送達に、金属粒子上への候補遺伝子DNAの沈降が必要でないように考える。しかし粒子はDNAで塗布されるよりむしろDNAを含有すると考えられる。それ故DNA塗布粒子は粒子衝突によりDNA送達レベルを増加できるが、それ自身は必要ではないことを提案する。

【0127】

加速による植物細胞へのDNA送達法の具体例は微粒子銃粒子送達系であり、これを用いてDNA又は細胞塗布粒子をステンレススチール篩い又はナイテックス(Nytex)篩いのような篩いを通して、懸濁培養植物細胞で覆ったフィルター表面上に推進できる。この篩いにより粒子が大きい凝集物でレシピエント細胞に送達されないように分散される。発射装置と衝撃を加える細胞間に介在する篩いにより発射粒子凝集物の大きさが減少し、大きすぎる発射粒子がレシピエント細胞に与える損傷の減少に寄与出来ると考えられる。

【0128】

微粒子銃法技術は広く利用でき、実質的にいずれの植物種の形質転換にも使用できる。微粒子銃法による形質転換された種の例としては、トウモロコシ(国際公開第WO95/06128号)、大麦(リタラ等(Ritala et al.)、1994年;ヘンスゲンス等(Hensgens et al.)、1993年)、小麦(ここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5563055号)、米(ヘンスゲンス等(Hensgens et al.)、1993年)、カラスムギ(トルベット等(Torbet et al.)、1995年;トルベット等(Torbet et al.)、1998年)、ライ麦(ヘンスゲンス等(Hensgens et al.)、1993年)、サトウキビ(バウワー等(Bower et al.)、1992年)及びサトウモロコシ(カサ等(Casa et al.)、1993年;ハギオ等(Hagio et al.)、1991年)のような単子葉植物種、更にはたばこ(トメス等(Tomes et al.)、1990年;ビュジング(Buising)、ベンバウ(Benbow)、1994年)、大豆(ここに全体を文献として具体的に組み込まれている米国特許第5322783号)、ひまわり(ニッテル等(Knittel et al.)、1994年)、ピーナッツ(シングシット等(Singsit et al.)、1997年)、綿(マッカバー(McCabe)、マーティネル(Martinell)、1993年)、トマト(バンエック等(VanEck et al.)、1995年)及び通常マメ科植物(ここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5563055号)を含む多数の双子葉植物が挙げられる。

【0129】

衝撃により懸濁細胞はフィルターか固体培地上に濃縮される。代わりに未熟胚又は他の標的細胞を固体培地上に配置しても良い。衝撃を加える細胞をマクロプロジェクティル阻

止プレート下の適当距離に配置する。必要ならば一つ以上のふるいを加速装置と衝突を加える細胞間に配置しても良い。

【0130】

アグロバクテリウム仲介転移は、DNAが全植物組織に導入でき、その結果プロトプラストからの無傷植物再生の必要性が回避できるので、植物細胞への遺伝子導入に広く利用できるシステムである。植物細胞へのDNA導入にベクターを組み込むアグロバクテリウム仲介植物の使用は技術的に周知である。例えばフラリー等 (Fraley et al.) (1985年)、ロジャース等 (Rogers et al.) (1987年) 及びここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5563055号に記載されている方法を参照。

【0131】

アグロバクテリウム仲介形質転換は双子葉植物で最も有効で、シロイヌナズナ、たばこ、トマト及びジャガイモを含む双子葉植物形質転換の好ましい方法である。実際アグロバクテリウム仲介形質転換は多年にわたりごく普通に双子葉植物で用いられてきたが、最近になって初めて単子葉植物に適用できるようになった。アグロバクテリウム仲介形質転換技術の進歩により、現在ほぼ全ての単子葉植物に適用できる技術になった。例えばアグロバクテリウム仲介形質転換技術は、現在米 (ヒエイ等 (Hiei et al.)、1997年；ザン等 (Zhang et al.)、1997年；ここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5591616号)、小麦 (マッコーマック等 (McCormac et al.)、1998年)、大麦 (ティンゲイ等 (Tingay et al.)、1997年；マッコーマック等 (McCormac et al.)、1998年) 及びトウモロコシ (イシディア等 (Ishidia et al.)、1996年) に適用された。

【0132】

現代のアグロバクテリウム形質転換ベクターは大腸菌と同様にアグロバクテリウムで複製でき、記載のように便利な操作が可能である (クリー等 (Klee et al.)、1985年)。更にアグロバクテリウム仲介遺伝子送達用ベクターでの最近の技術的進歩により、種々のペプチドコーディング遺伝子が発現可能なベクター構築を助けるベクターの遺伝子と制限酵素部位の配置が改良された。記載のベクター (ロジャース等 (Rogers et al.)、1987年) は、挿入ポリペプチドコーディング遺伝子の直接発現に関するプロモーターとポリアデニル化部位が隣接する便利なマルチリンカー領域を有し本目的に適する。更に武装Tリンパ球抗原 (Ti) 遺伝子と安全Ti遺伝子両者含有のアグロバクテリウムは形質転換に使用できる。アグロバクテリウム仲介形質転換が効率的なこれらの植物株では、遺伝子転移の容易で明確な性質によりこれが選ばれた方法になる。

【0133】

植物プロトプラストの形質転換はリン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール処理、電気穿孔及びこれら処理の組み合わせに基づく方法を用いて達成できる (例えばポットリカス等 (Potrykus et al.)、1985年；ロルズ等 (Lorz et al.)、1985年；オミルレー等 (Omirulleh, et al.)、1993年；フロム等 (Fromm et al.)、1986年；ウチヤマ等 (Uchiyama, et al.)、1986年；カリス等 (Callis et al.)、1987年；マルコッテ等 (Marcotte et al.)、1988年参照)。

【0134】

これらシステムの他の植物株への応用は、プロトプラストからのその特定植物株再生能に依存する。プロトプラストからの穀類再生に関する具体法は記載されている (フジマラ等 (Fujimara, et al.)、1985年；トリヤマ等 (Toriyama, et al.)；ヤマダ等 (Yamada, et al.)、1986年；アブダラー等 (Abdullah et al.)；オミルレー等 (Omirulleh, et al.)、1993年及び米国特許第5508184号で、それぞれはここに全体を文献として具体的に組み入れている)。穀類プロトプラストの直接取り込み形質転換の使用例としては、米 (ゴッシュービスワズ等 (Ghosh-Biswas et al.)、1994年)、サトウモロコシ (バットロウ (Battraw)、ホール (Hall)、1991年)、大麦 (ラッゼリ (Lazzeri)、1995年)、カラスムギ (ゼン (Zheng)、エドワード (Edwards)、1990年) 及びトウモロコシ (オミルレー等 (Omirulleh, et al.)、1993年)

が挙げられる。

【0135】

プロトプラストから旨く再生出来ない植物株を形質転換するには、別の無傷細胞又は組織へのDNA導入法が用いられる。例えば未熟胚又は外植片からの穀類再生は記載のように達成できる（バジル（Vasil）、1989年）。又炭化ケイ素繊維伸介形質転換も原形質体化有りか又は無しで利用できる（ケップラー（Kaeppler）、1990年；ケップラー等（Kaeppler et al.）、1992年；ここに全体を文献として具体的に組み入れた米国特許第5563055号）。この技法による形質転換は炭化ケイ素繊維をDNA溶液中の細胞と一緒に攪拌して達成される。細胞が穿刺されるとDNAが受動的に進入する。この技法は例えば単子葉穀類のトウモロコシ（ここに全体を文献として具体的に組み入れた国際公開WO95/06128号；トンプソン（Thompson）、1995年）と米（ナガタニ（Nagatani）、1997年）で成功裏に用いられた。

10

【0136】

微粒子銃法の最適化

本発明に基づく微粒子銃法形質転換に関する物理的パラメーターと生物学的パラメーターの両者が最適化できる。物理的因子はDNA／マイクロプロジェクタイト沈殿の操作が関与する因子、又はマクロプロジェクタイト又はマイクロプロジェクタイトのいずれかの飛行速度に影響する因子である。生物学的因子としては、衝撃関連外傷の緩和を助けるため標的細胞浸透圧の調整、粒子軌道に対する未熟胚又は他の標的組織の配向、及び直線化DNA又は高次コイル化無傷プラスミドのような形質転換DNAの性質のような、衝撃前と衝撃直後の細胞操作に関与する全段階が挙げられる。衝撃前操作が未熟胚形質転換の成功に特に重要であると考えられる。

20

【0137】

従って種々の衝撃パラメーターでの条件を小研究で完全に最適化したいと考える。特にDNA濃度、ギャップ距離、飛行距離、組織距離及びヘリウム圧のような物理的パラメーターを調整したい。更にヘリウム等級の形質転換効率への影響を考える。例えば工業用グレード（純度99.99%）ヘリウムと超高純度（純度99.999%）ヘリウム使用の衝撃で形質転換効率の差が示されたが、どちらが衝撃の使用により有利であるかは現在明らかでない。又レシピエント細胞の生理状態に影響し、その結果形質転換効率と組み込み効率に影響する条件を修正して、外傷減少因子（TRF）を最適化できる。例えばレシピエント細胞の浸透圧状態、組織水和及び継代培養又は細胞周期を最適形質転換に調整できる。

30

【0138】

更に弾道形質転換の最適化のために、衝撃に関する物理的パラメーターと生物学的パラメーター両者に取り組む。物理的因子はDNA／マイクロプロジェクタイト沈殿操作関与の因子か、又はマクロプロジェクタイト又はマイクロプロジェクタイトのいずれかの飛行速度に影響する因子である。生物学的因子は衝撃直前及び衝撃直後の細胞操作が関与する全段階を含む。浸透圧環境、衝撃パラメーター及びプラスミド配置のような衝撃前培養条件は最大数の安定な形質転換体を生ずるように調節された。

【0139】

(i) 物理的パラメーター

40

1. ギャップ距離

可変ネスト（マクロフォルダー）を調整して、破裂板とマクロプロジェクタイト間距離、即ちギャップ距離を変化できる。この距離は0から2cmまで変化できる。より狭いギャップによる予期効果は、マクロプロジェクタイトとマイクロプロジェクタイト両者の速度増加、衝撃波の増加（組織の飛散と組織外傷の増加をもたらす）、及びマイクロプロジェクタイトのより深い侵入である。より大きなギャップ距離は反対効果を有するが、生存率、それ故安定な回収形質転換体の全数を増加でき得るであろう。

【0140】

2. 飛行距離

50

固定ネスト（可変ネスト内に含有）はマクロプロジェクタイトが横切る飛行路を調節するために、前もって決めた増分 0.5 cm でスパーサーリングを配置して 0.5 乃至 2.25 cm の間で変化できる。短い飛行路では飛行中のマクロプロジェクタイトの安定性をより大きくできるが、マイクロプロジェクタイトの全体速度を減少する。飛行中の安定性増加は、例えば集中β-グルクリオニターゼ（GUS）増殖巣数を増加する。より大きな飛行距離（ある点まで）は速度を増加するが、又飛行中の不安定性を増加する。観察に基づいて通常衝撃は約 1.0 cm 乃至 1.5 cm の飛行路長さで行うことを推奨する。

【0141】

3. 組織距離

組織の銃チャンバー内配置はマイクロプロジェクタイト侵入に大きな効果を有する。マイクロプロジェクタイト飛行路の増加により速度と衝撃波関連の外傷を減少する。速度減少は又マイクロプロジェクタイト侵入がより浅くなる。

【0142】

4. ヘリウム圧

破裂板の型と数を操作して、ガス加速管内圧力を 400 乃至 2000 ポンド／平方インチ（psi）の間で変化できる。安定な形質転換での最適圧は 1000 乃至 1200 psi の間に決定された。

【0143】

5. ミクロプロジェクタイトの塗布

微粒子銃法に関して DNA がその形質転換に適する形態でレシピエント細胞に送達されるようにマイクロプロジェクタイトに付着（即ち“コート”）する。この点に関しては少なくとも形質転換する DNA の幾らかが形質転換を起こす標的細胞に利用できる必要があるが、同時に送達時にその DNA はマイクロプロジェクタイトに付着する必要がある。それ故形質転換する DNA がマイクロプロジェクタイトから利用可能なことは、マイクロプロジェクタイトを標的細胞に送達後、形質転換する DNA とこのマクロプロジェクタイト間結合の物理的反転を含む。しかし DNA の非結合セグメント又はこのマイクロプロジェクタイトとの物理的付着を含む他分子の切断の結果として標的細胞利用の可能性が起こる場合には、この必要性は無くなる。更に形質転換する DNA とマイクロプロジェクタイトに直接的又は間接的のいずれかで付着する他分子間結合の切断結果として利用の可能性が起こっても良い。更に標的細胞の形質転換は形質転換する DNA とレシピエント細胞のゲノム DNA 間の直接組み替え経由で起こっても良い。それ故ここで用いた“塗布した”マイクロプロジェクタイトは、形質転換する DNA が標的細胞に送達され、なお形質転換が起こるように標的細胞に到達できる標的細胞の形質転換に利用できるマイクロプロジェクタイトである。

【0144】

形質変換する DNA を標的細胞に送達できるマイクロプロジェクタイト塗布技術のいずれもが使用できる。本発明で効を奏することが示されたマイクロプロジェクタイト塗布法を具体的にここに開示する。しかし代替技術を用いて DNA をマイクロプロジェクタイト粒子に結合できる。例えば粒子はストレプトアビジンと長鎖チオール切断可能なビオチニル化ヌクレオチド鎖で標識化した DNA 末端を塗布しても良い。この DNA はストレプトアビジンとビオチンとの相互作用により粒子に接着するが、細胞に存在する還元剤によりチオール結合を還元し細胞内で放出される。

【0145】

代わりに粒子は酸化金粒子表面を機能化して遊離アミノ基を供与して調製しても良い。強い陰電荷を有する DNA は機能化粒子と結合する。更に荷電粒子は PDS-1000 微粒子銃装置使用のマイラーフライヤーディスク表面上に制御配列で蒸着し、その結果標的組織に送達する粒子分子の制御を助けても良い。

【0146】

上に検討したように更にマイクロプロジェクタイト塗布に用いる DNA 濃度が、導入遺伝子の単一コピー含有形質転換体の回収に影響することを提案する。例えば低濃度の DNA

Aは必ずしもこの形質転換効率を変えないが、代わりに単一コピー挿入事象の比率を増加できる。この点で開始マイクロプロジェクタイト1.8mg毎に、約1ng乃至2000ngの形質転換するDNAが使用できる。該発明の他実施形態では開始マイクロプロジェクタイト1.8mg毎に、約2.5ng乃至1000ng、2.5ng乃至750ng、2.5ng乃至500ng、2.5ng乃至250ng、2.5ng乃至100ng又は2.5ng乃至50ngの形質転換するDNAを使用できる。

【0147】

又種々の他法を用いて形質転換効率の増加、及び／又は低コピー形質転換効率事象の相対比率が増加できる。例えば該発明者はアルカリ性ホスファターゼ、又は形質転換前にDNA末端を平滑化する試薬で末端修飾した形質転換するDNAについて熟慮した。更に不活性担体DNAは形質転換するDNAを含んでも良く、その結果使用DNAの全体量を低下することなしに形質転換DNAの有効濃度を低下できる。これらの技術については更に1997年12月22日に申請の米国特許出願番号第08/995451号に記載され、その開示の全体をここに具体的に文献として組み入れる。

【0148】

(ii) 生物学的パラメーター

培養条件と他因子は標的細胞の生理状態に影響でき、形質転換効率及び組み込む効率に大きな影響を有する。第一に衝撃作用によりエチレン産生を刺激し、組織老化をもたらすかもしれない。抗エチレン化合物添加により形質転換効率を増加するかもしれない。第二に導入DNAの組み込みには細胞周期のある時点がより適切であることを提案する。従って細胞培養液の同期化により形質転換体の産生頻度を増強できる。例えば同期化は冷処理、アミノ酸飢餓、又は他の細胞周期停止剤を用いて達成できる。第三に組織水和度は又衝撃関連の外傷量と同様にマイクロプロジェクタイトの細胞壁侵入能に寄与できる。

【0149】

粒子軌道に対する胚又は他の標的組織の位置と配向は又重要であり得る。例えばPDS-1000微粒子銃装置は標的ペトリ皿表面に均一に広がる粒子を発生しない。このプレート中心の粒子速度の方がペトリ皿中心から遠い距離の粒子速度より速い。それ故一部の人には“死の帯域”と呼ばれる皿中心を避けるように、標的組織をペトリ皿に置くのが有利である。更に標的軌道に対する標的組織の配向も又重要である。組織が粒子流れに方向に植物を最も再生し易いように配向するのが望ましいと考える。例えば未熟胚の小板が最大胚形成能を持つ細胞を含み、その結果粒子流れ方向に配向する必要がある。

【0150】

又僅かに原形質分離した酵母細胞により形質転換効率が増加できることが報告された（アルマレオ等（Armaleo et al.）、1990年）。細胞の浸透圧状態の変化がマイクロプロジェクタイト侵入関連外傷の低減を助けると仮定された。更に成長段階と細胞周期段階が形質転換に関して重要である。

【0151】

1. 浸透圧調整

浸透圧前処理は形質分離細胞の膨圧減少の結果衝撃関連の損傷を減少しそうなことが示唆された。以前の研究で新鮮な培地と浸透圧調整培地の両者に継代培養後、GUSを一過的に発現する細胞数が増加した（ここに全体を具体的に文献として組み入れた国際公開WO95/06128号）。90分の前処理時間ではより短時間より高いGUS発現増殖巣数を示した。培地kg当たり500ミリオスモルで90分間インキュベートした細胞は、対照に比べ約3.5倍の一過性GUS増殖巣増加を示した。好ましくは衝撃前に未熟胚を12%ショ糖含有培地で4-5時間前培養する。衝撃後第二培養を12%ショ糖で16-24時間実施する。代わりにII型細胞を衝撃前に0.2Mマンニトールで3-4時間前処理する。他の浸透圧活性溶質による1-6時間の細胞前処理が又望まれると考える。

【0152】

2. プラスミド配置

幾つかの場合には制限なしでアンピシリン、カナマイシン及びテトラサイクリン耐性を含

10

20

30

40

50

む抗生物質耐性遺伝子のような細菌宿主、例えば大腸菌中のプラスミドベクター維持に必要なDNA配列と、DNA複製の原核生物起源を含んでいない細胞に候補遺伝子DNAを送達するのが好ましい。この場合には形質転換するDNA含有DNA断片が形質転換前に精製できる。代表的精製法は1. 2%低融点温度アガロースゲルでのゲル電気泳動後、アガロースゲルのゲル薄片を溶融して6乃至10倍過剰のトリス-E D T A緩衝液(10 mMトリス塩酸、pH 8.0、1 mM E D T A、70℃-72℃)に回収し、凍結融解(37℃で融解)し、このアガロースを遠心分離によりペレット化する。次いでキアゲン(Qiagen) Q-100カラムを用いてDNAを精製しても良い。高効率DNAの回収のためにカラム流速を40 ml/hに調節しても良い。

【0153】

単離DNA断片は種々の電氣的溶出技術、アガロースの酵素消化又はDNAのガラスビーズ(例えばジーンクリーン(Gene Clean))との結合を用いてアガロースゲルから回収できる。更に高速液体クロマトグラフィ(HPLC)及び/又は磁気粒子を用いてDNA断片を単離しても良い。DNA断片単離の代案としてプラスミドベクターを制限酵素で消化でき、このDNAは発現カセット断片の事前精製なしでトウモロコシ細胞に送達できる。

【0154】

組織培養は培地と制御環境が必要である。“培地”とは細胞をインビトロ、即ち無傷の生きた生物外で成長するのに用いる多数の栄養混合物を意味する。この培地は通常大部分の細胞型の成長に必要な種々の種類の成分(塩類、アミノ酸類、成長調整物質、糖類、緩衝液類)の懸濁液である。しかし特異的細胞型の各々は成長に特定範囲の成分比率が必要で、最適の成長にはより特異的範囲の処方さえ必要となる。細胞成長速度は開始培養液の中でも、この細胞型が成長できる数々の培地で変わる。

【0155】

栄養培地は液体として調製するが、この液体を固体支持材提供可能な材料に加えて固体化しても良い。寒天はこの目的に最も良く使用される。バクトアガー、ハゼルトン(Hazeltone)寒天、ゲルライト(Gelrite)及びゲルグロ(Gelgro)は組織培養液での植物細胞成長に適した特異型固体支持材である。

【0156】

幾つかの細胞型は液体懸濁物又は固体培地で成長分裂する。ここに開示のようにトウモロコシ細胞は液体懸濁物又は固体培地で成長するが、懸濁培養物からの植物再生には発達のある時点で液体培地から固体培地への移送が必要である。培養液での細胞分化の型と程度は、使用培地の形と環境、例えばpHだけでなく、又培地が固体か又は液体のいずれかによっても影響される。

【0157】

レシピエント細胞標的物としては制限なしで、茎頂(米国特許第5736369号)、I型カルス、II型カルス及びIII型カルス、未熟胚及び小孢子、花粉、精子及び卵細胞のような配偶子細胞を含む成長点細胞が挙げられる。稔性植物が再生できる任意の細胞がレシピエント細胞として有用であると考えられる。I型カルス、II型カルス及びIII型カルスは、制限なしで未熟胚、苗頂端分裂組織、小孢子及び類似物を含む組織供給源で開始できる。カルスとして増殖できるこれらの細胞は、又遺伝子形質転換のレシピエント細胞でもある。本発明は未熟胚の形質転換技術と後続の稔性形質転換植物の再生技術を提供する。未熟胚の形質転換により長期のレシピエント細胞培養物発達の必要が無くなる。花粉と同様にその前駆体細胞の小孢子は、遺伝子形質転換のレシピエント細胞、又は受精時に取り込む異質DNAを運ぶベクターとして機能できる。花粉の直接形質転換は細胞培養の必要をなくすであろう。成長点細胞(即ち連続細胞分裂が可能で、細胞学的未分化細胞外観で特徴付けられる植物細胞で、通常根端、茎頂部、側芽などのような植物成長点又は組織に見られる)は、他の形のレシピエント植物細胞を表す。これらの器官分化と分化全能性での未分化成長能力のために、単一形質転換成長点細胞が完全形質転換植物として回収出来るかもしれない。実際胚形成懸濁培養物はインビトロ成長点細胞系であり得、

10

20

30

40

50

未分化状態で培地環境に制御されながら継続細胞分裂能を保持できる。

【0158】

所望DNAセグメントでは形質転換するためのレシピエント細胞として働く培養植物細胞は、トウモロコシ細胞を含む任意の植物細胞で良いが、より具体的には各種のトウモロコシ (*Zea mays* L.) 体細胞の細胞は種々の型がある。胚形成細胞は胚形成により植物再生を誘発できる体細胞の一例である。非胚形成細胞は通常この方法では応答しない細胞である。非胚形成細胞の例は特定のブラックメキシカンスイート (BMS) トウモロコシ細胞である。

【0159】

本発明との関連で有用な胚形成カルスと懸濁培養物、例えば形質転換のレシピエント細胞の発生は、米国特許第5134074号と米国特許第5489520号に記載されており、各々をここに全体を文献として取り入れる。

10

【0160】

レシピエント細胞を細胞集団内で濃縮する特定の技術が利用できる。例えば脆弱な胚形成組織の手作業による選択培養後、通常II型カルスの発生により微粒子銃形質転換で用いるレシピエント細胞が濃縮される。特にここに開示の培地を用いた懸濁培養は、任意の所定集団での非レシピエント細胞の対するレシピエント細胞の比を改善できる。レシピエント細胞選択に使用できる手作業による選択技術としては、例えば細胞形態と分化の評価が挙げられ、又種々の物理的又は生物学的選択手段が用いられる。凍結保存は又レシピエント細胞の可能な選択法である。

20

【0161】

例えばII型カルス表面の胚細胞選択により、手作業によるレシピエント細胞の選択は、培養前（固体培地又は懸濁状での培養のいずれか）にレシピエント細胞を濃縮する試みに使用できる一手段である。好ましい細胞は細胞集団表面に位置する細胞であり、更に分化の欠如、その大きさ及び濃密な細胞質により同定可能である。好ましい細胞は通常分化がより少ない細胞、又は未だ分化を犯さない細胞である。従って細胞質的に濃密で、高い核対細胞質比（例えば細胞学的観察により決定する）で比較的非空胞化であり、大きさが小さく（例えば10–20 μm ）、持続的分裂と体細胞前芽形成可能な細胞を同定選択したい。

【0162】

この細胞の他の同定手段が使用できることを提案する。例えば胚形成細胞のような比較的非透過性膜を有する細胞により排除され、根類似細胞と蛇型細胞（所謂その蛇類似外観による）のような比較的分化した細胞により取り上げられるエバンスブルーのような染料を使用することである。

30

【0163】

レシピエント細胞同定の他の可能な手段としては、細胞化学的染色により検出できるグルタミン酸脱水素酵素のような胚形成細胞のアイソザイムマーカの使用が挙げられる（フランズ等 (Fransz et al.)、1989年）。しかしグルタミン酸脱水素酵素を含むアイソザイムマーカの使用は、なお比較的高代謝活性を有する根状細胞のような非胚形成細胞ではある程度の擬陽性をもたらし得ることを警告する。

40

【0164】

一実施形態では候補遺伝子由来のハイブリッドmRNA分子、又はハイブリッドmRNA分子由来のハイブリッドタンパク質は、雑種強勢を産生するよりはむしろ病状を克服、治療又は少なくとも緩和する。上記の実験プロトコル概要を用いてこの結果が得られることがこの分野の熟練者に正しく理解される。

【0165】

通常“治療する”、“治療”と言う用語及び類似語は、ここでは所望の薬理効果及び／又は生理効果を得るための個体又は被験者、その組織又は細胞に影響する意味で用いる。その効果は疾患又はその兆候や症状を完全に又は部分的に防止するという点で予防的であり、及び／又は疾患の部分的又は完全治癒と言う点で治療的であり得る。ここで用いた“

50

治療する”とは、植物又は動物の疾患の治療又は予防のいずれも包含し、以下が含まれる。(a) 病気に罹りやすいが未だ病気に罹ったとは診断されていない植物又は動物で病気が起こるのを予防する、(b) その疾患を阻害する、即ちその発達を停止する、又は(c) その病状を軽減又は寛解する、即ち病状の退縮を起こす、又は(d) 動物又は植物の快適な暮らし、健康又は長寿を増強する。

【0166】

一旦植物又は動物が病気に苦しむと診断され、候補遺伝子又は遺伝子の組み合わせが同定されると、強制雑種に関して上述の技術を用いるか又は標準的医療技術又は農業技術のいずれかを用いて、これら遺伝子又は遺伝子産物をこの植物又は動物に投与できる。

【0167】

“投与”、“投与する”及び“投与した”と言う用語はここでは互換可能に用いる。例えば候補遺伝子産物は、舌下を含む経口的、局所的又は非経口的に在来の無毒で医薬品承認の担体、アジュバント及び媒体含有の単位用量処方投与できる。ここで用いた非経口と言う用語は、皮下注入、エアロゾル、静脈内、筋肉内、くも膜下腔、頭蓋内注入又は点滴法、直腸又は膣を含む。

【0168】

本発明の他様態ではハイブリッドタンパク質を単離し、更にそれらがHV又はHDに効果を有するか否かを定める研究ができる。例えばハイブリッドタンパク質の免疫原性の変性は、そのハイブリッドタンパク質アミノ酸配列を一連のプロテオミクスの物理化学的分析を行って決められる。多くの異なるコンピューター処理分析プログラムがコンパイルされてきた。ハイブリッドタンパク質免疫原性と野生型親のそれぞれとの比較に用いるプログラムのパッケージソフト例は、エピトープインフォマティクス(ePitopes Informatics)により提供されている。参考資料に関しては<http://www.epitope-informatics.com/References.htm#ModernAb>参照。

【0169】

限定はされないが物理化学的物性は以下の調査プログラムを用いて決定する。

- i/タンパク質抗原性予測アルゴリズム
- ii/タンパク質疎水性アルゴリズム
- iii/タンパク質親水性アルゴリズム
- iv/タンパク質可動性予測アルゴリズム
- v/タンパク質二次構造アルゴリズム

【0170】

これらのタンパク質の物理化学的物性値は当業者には周知である。ハイブリッドタンパク質と野生型タンパク質間のインビトロでの構造機能的な差異は、一連の無料で入手可能な分析プログラムを用いてそのアミノ酸配列を照合して決定する。野生型タンパク質と比較したハイブリッドタンパク質の可能な構造特性又は機能特性は、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)データベース、EMBOSS(European Molecular Biology Open Software Suite)データベースにより利用できるソフトウェア、ワイズマン科学研究所(Weizmann Institute of Science)のジーンカード(GeneCards)ウェブサイトにより利用できるソフトウェアを含む広範囲のプロテオミクス分析ソフトウェアを用いて評価する。

<http://bioinfo.wizmann.ac.il/cards/index.stml>

【0171】

以下の非制限例の参照目的のためだけに該発明を更に説明する。しかし以下の例は説明のためだけで、上述の該発明の一般性を制限するとは決して取ってはいけないと理解する必要がある。特に該発明はDNMT2対立遺伝子を用いて候補遺伝子同定との関連で上に詳細に説明したが、ここでの知見はこの遺伝子又は対立遺伝子に限定されないことは明らかに理解される。

【0172】

実施例1 ヘテロ接合子孫でハイブリッドmRNA分子を形成する新規生化学経路の同定

10

20

30

40

50

二つの対立遺伝子型の遺伝子DNMT2が記載されている（フランキナ等（Franchina et al.）、（2001年）、ヒューマンヘレディティ（Hum. Hered.）、52巻、p. 210）。DNMT2はDNAメチル化過程で関与する酵素をコード化する。対立遺伝子DNMT2Iの一つはエクソン2の104位にヌクレオチドGと、エクソン4の50位にヌクレオチドCを含む。代替え対立遺伝子のDNMT2IIはこれらの位置にそれぞれヌクレオチドAとヌクレオチドTを含む。従って二つの対立遺伝子型のDNMT2それぞれの間でのエクソン2とエクソン4内DNA配列の差異により、最終mRNA分子でのエクソン2とエクソン4の対立遺伝子起点が決定できる。これらの知見を用いてハイブリッド型のmRNAが、各対立遺伝子エクソンを同一成熟mRNA分子に取り入れることでヘテロ接合子孫に形成され、その結果ヘテロ接合子孫に独特の新規ポリペプチド又はタンパク質分子が産生するか否かを試験した。

10

【0173】

各DNMT2対立遺伝子のエクソン又はその一部が、一次転写物スプライシング後に同一成熟mRNA分子に組み入れられるか否か、及び如何に効果的に組み入れられるかを決めるために、分離研究により二つの対立遺伝子形DNMT2に関してヘテロ接合であると確認された二つの被験者III1とIII2の末梢血リンパ球（PBL）からmRNAを単離した（フランキナ等（Franchina et al.）、上記参照）。

【0174】

DNMT2のエクソン2とエクソン4含有の約480bpの相補DNA領域を増幅したプライマーを用いて、このmRNAを逆転PCRに付した。被験者III1と被験者III2の長さ約480bpの逆転PCR産物がクローンされ、各逆転PCR産物の一連のクローンは配列決定された。

20

【0175】

表1に示すように被験者III1で配列決定した15個のクローン中13個の挿入断片はDNMT2の両アレル発現を示し、予期通り成熟mRNA分子のエクソン2とエクソン4のシス構造を示した。しかしこのクローンの一つはDNMT2I対立遺伝子のエクソン2とDNMT2II対立遺伝子のエクソン4を含むスプライス産物を含んでいた。別のクローンはDNMT2II対立遺伝子のエクソン2と同様にDNMT2I対立遺伝子のエクソン4を含んでいた。この知見の再現性を評価し、被験者III1に見られる二つの見かけのハイブリッドmRNA分子が、ある形の有糸分裂組み替え事象の結果である可能性を排除するために、被験者III2のPBLのmRNA種を同様に調べた。

30

【0176】

表1に示すように14個のクローン中11個はDNMT2の両アレル発現とシスエクソン構造を示す挿入断片を含有した。しかし三個の別のクローンの構造はハイブリッドmRNA分子が組み立てられていることを示した。これらの内の二個はDNMT2II対立遺伝子のエクソン2とDNMT2I対立遺伝子のエクソン4を含有した。別のクローン配列によりDNMT2I対立遺伝子のエクソン2とDNMT2II対立遺伝子のエクソン4を組み入れてスプライスしたmRNA分子が組み立てられていることが明らかになった。

【0177】

次いで二つの代替えアレル型のDNMT2それぞれにホモ接合であることが確認された二つの別被験者、III3とIII4（フランキナ等（Franchina et al.）、上記）のPBLからmRNAを単離した。被験者III1と被験者III2のPBLに見られるハイブリッドmRNA DNMT2分子が、先端切断逆転写産物形成により逆転写PCRのPCR段階で鋳型乗り換えによりインビトロで産生する可能性を排除するために、被験者III3と被験者III4の当量mRNAのインビトロ作成混合物を、使用被験者III1と被験者III2のmRNAと同様に処理した。表1に示すように13個のクローンの挿入断片配列を参照するとハイブリッドmRNA分子は見いだされなかった。これらに基づいてこれら知見により全スプライスDNMT2 mRNA分子の20%がハイブリッド型を含むことが確立された。

40

表1 エクソン2とエクソン4内の多型位置に存在するヌクレオチドによる末梢血リンパ

50

球でのスプライスDNMT 2 mRNA分子分布

【表 1】

DNMT 2転写物		被験者		
エクソン2の ヌクレオチド104	エクソン4の ヌクレオチド50	III 1	III 2	混合物*
G	C	5	5	0
A	T	0	6	5
G	T	1	1	0
A	C	1	2	0

10

注：遺伝子型DNMT 2 I / I Iは被験者I I I 1、I I I 2に、DNMT 2 I / I及びDNMT 2 I I / I Iは被験者I I 3とI I 4でそれぞれ系図分析により確認された（フランキナ（Franchina）、ケイ（Kay）、ヒューマンヘレディティ（Hum. Hered.）、52巻、p. 210（2001年）参照）。

*被験者I I I 1、I I I 2、（I I 3及びI I 4）のホモ接合DNMT 2 I及びNDMT 2 I I親のmRNA混合物を又逆転写PCRに付し、その産生物をクローンし、配列決定した。混合mRNA試料のG-T又はA-CスプライスDNMT 2 mRNA分子を特定する挿入断片は見いだされなかった。これらの結果によりmRNA分子のトランスエクソンの両アレル構造を含むインビボ一次転写物スプライスシステムの存在が確認された。

20

【0178】

実施例2 ヒトHVモデルとしての骨粗鬆症

骨粗鬆症は閉経後女性のほぼ40%が受ける骨障害である。これは破骨細胞による骨吸収増加により、骨密度の低下と骨折し易さの増加を起こして生ずる。カルシトニンは破骨細胞のカルシトニン受容体と結合し、骨崩壊を起こすその活性を減少するので骨粗鬆症治療に用いられる。

【0179】

タブレー等（Taboulet et al.）、（1998年）、ヒューマンモレキュラージェネティク（Hum. Mol. Genet.）、7巻、p. 2129に、表2に示すように野生型カルシトニン受容体対立遺伝子にヘテロ接合な被験者は、同一野生型対立遺伝子形にホモ接合な被験者に比べより高い骨密度を有し、骨折の危険を減少することを示した。

30

【0180】

表2に異なる対立遺伝子形のカルシトニン受容体の異なるアミノ酸をコード化するヌクレオチド変化のエクソン位置を示す。これらのコード配列変異体はNCBIデータベースで検索した。表2に示すようにエクソン1はアミノ酸位126でロイシン又はアルギニンのいずれかをコード化する一方、アミノ酸位447でエクソン9内のヌクレオチドの差異によりプロリン又はロイシンをコード化する。カルシトニン受容体の126位と447位の代替えアミノ酸をコード化するヌクレオチド配列分布の差異は、異なる対立遺伝子型のカルシトニン受容体遺伝子にヘテロ接合な被験者に新規又はハイブリッド型カルシトニン受容体形成に必要な構造的基準を満たす。

40

表2 代替えカルシトニン受容体対立遺伝子でのアミノ酸差異物をコード化するヌクレオチド変化物でのエクソン位置

【表 2】

アミノ酸位	エクソン	アミノ酸代替物
126	1	(L) ロイシン
126	1	(R) アルギニン
447	9	(P) プロリン
447	9	(L) ロイシン

10

【0181】

ここに記載の該発明に従うと、カルシトニン受容体内の126位と447位アミノ酸の容認組み合わせは、(a) ロイシン／プロリン、(b) ロイシン／ロイシン、(c) アルギニン／プロリン及び(d) アルギニン／ロイシンを含み、その内の二つは野生型対立遺伝子を含む一方、他の二つは骨密度と骨折し易さに影響するハイブリッド型カルシトニン受容体を含む。

【0182】

実施例 3 新規生化学経路による哺乳類HVモデルとしてのアルギニノコハク酸尿症

20

ヒトでは酵素のアルギニノコハク酸分解酵素 (ASL) をコード化する遺伝子で5つの異なる対立遺伝子型の遺伝子が同定されている。例えばそれらの内の幾つかのASL (D87G)、ASL (Q286R) 及びASL (A398D) は変異体型ASLをコード化する。これらの変異体型ASLのそれぞれにホモ接合な被験者は不活性型の酵素を産生し、アルギニノコハク酸尿症として知られる疾患の発病をもたらす。

【0183】

ASL (Q286R) とASL (D87G) のような変異誘発遺伝子型ASLを、それに冒された親それぞれからヘテロ接合型を受け継ぐ子孫では、ASL活性を保持したHV型が観察されることが良く認められている (ここに文献として取り入れたウォーカー等 (Walker et al.)、(1997年)、ジャーナルオブバイオケミストリー (J. Biol. Chem.)、272巻、p. 6777参照)。ASL (D87G) とASL (Q286R) をコード化する対立遺伝子は、異なるASLエクソン内に位置するヌクレオチド差異物により特徴付ける。アミノ酸位87でアスパラギン酸又はグリシンを産生するヌクレオチド変異体はエクソン3に位置する一方、グルタミン又はアルギニンをコード化するヌクレオチド変異体はエクソン11内に位置する。エクソン3とエクソン11の87位と286位の代替えアミノ酸をそれぞれコード化するヌクレオチド配列差異物の局在化は、二つの異なる変異体型のASL遺伝子にヘテロ接合な被験者で正常ASL酵素の合成が可能になるのに必要な構造的基準を満たす。

30

【0184】

実施例 4 新規生化学経路によるHVモデルとしてのシスチン尿症

40

シスチン尿症はシスチン及び他アミノ酸の腎吸収低下で特徴付けられるヒトの障害である。一つの形のシスチン尿症 (非1型シスチン尿症と呼ばれる) は、SLC7A9と名付けられた遺伝子の突然変異で起こることが示された。G105R、V170M及びA354Tのような変異体型SLC7A9のホモ接合性はシスチン再吸収の著しい減少をもたらす。フォント等 (Font et al.) により、(2001年)、ヒューマンモレキュラージェネティク (Hum. Mol. Genet.)、10巻、p. 305に示されたように、これら変異体型SLC7A9のそれぞれのヘテロ接合性はシスチン再吸収を劇的な保持する。モデルを保ちながら変異誘発遺伝子G105R、V170M及びA354Tを産生するSLC7A9内でのヌクレオチドの変化物はそれぞれエクソン4、エクソン5及びエクソン10に存在する。三つの変異体のSLC7A9のそれぞれをコード化するヌクレオチド変化物の局

50

在化は、上に示した三つの変異型 S L C 7 A 9 内の任意の二つにヘテロ接合な被験者の正常な活性 S L C 7 A 9 の合成に必要な構造的な必要性を満たす。

【0185】

実施例 5 新規生化学経路による哺乳類 H V モデルとしての寿命

クロト遺伝子 (K L) は 1 型推定膜タンパク質と同様に分泌型をコード化する。この分泌型は頭、胎盤、腎臓、前立腺及び小腸のような多くの異なる組織で発現されるが、その正確な機能は不明のままである。しかし欠損型相同遺伝子を有するマウスは、粥状動脈硬化、肺気腫及び不妊症を含むヒト老化に類似の症状を示すため、K L は長寿に影響することが認められている。又クロトが死亡率への影響が知られた因子の血圧を減少することが示された (アーキング等 (Arking et al.)、(2002 年)、プロシーディングオブナショナルアカデミーオブサイエンス、ユーエスエイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、99 巻、p. 856 参照)。

【0186】

H V のヒトモデルを保ちながら最近の研究により、ホモ接合被験者に比べヘテロ接合クロト被験者は少なくとも早期死亡のリスクがより小さいことが示された (アーキング等 (Arking et al.)、(2005 年)、サーキュレーションリサーチ (Circ. Res.)、96 巻、p. 412)。

【0187】

代替え対立遺伝子型のクロト遺伝子産物の異なるアミノ酸をコード化したヌクレオチド変化物のエクソン位置を表 3 に詳述する。コード領域の配列変異体は N C B I データベースで検索した。表 3 に示すようにエクソン 1 はアミノ酸位 15 でグルタミン又はプロリンのいずれかをコード化し、45 位でバリン又はフェニルアラニンのいずれかをコード化する。エクソン 2 は 352 位でバリン又はフェニルアラニンのいずれかをコード化し、370 位でセリン又はシステインのいずれかをコード化する。エクソン 3 内でヌクレオチド変化物によりコード化したセリン又はプロリンのいずれかはアミノ酸位 514 を占めても良い。

【0188】

表 3 に示した異なるクロトエクソン内の非同義ヌクレオチド変化物の分布は、ここに記述の新規生化学経路により少なくとも二つの野生型タンパク質と、最低六つのハイブリッドタンパク質をコード化できることを示している。

表 3 代替えクロト対立遺伝子のアミノ酸差異物をコード化するヌクレオチド変異体のエクソン位置

【表 3】

アミノ酸位	エクソン	アミノ酸代替え物
15	1	(Q) グリシン
15	1	(P) プロリン
45	1	(V) バリン
45	1	(F) フェニルアラニン
352	2	(V) バリン
352	2	(F) フェニルアラニン
370	2	(C) シスチン
370	2	(S) セリン
514	3	(S) セリン
514	3	(P) プロリン

【0189】

実施例 6 嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (C F T R) 変異複合ヘテロ接合体での H V モデルとしての嚢胞性線維症

嚢胞性線維症は世界的に最も一般的な遺伝病の一つである。これは事実上常染色体劣性遺伝で、多数の変異型 C F T R 遺伝子の内の二つの遺伝で起こる。疾患の兆候は以下に説明するように H V 型を反映し、非常に变りやすく、且つ任意の特定個体から遺伝の変異型ハロタイプで予測するのは難しい。

【0190】

この疾患は肺と膵臓を含む多臓器に影響し、出生時に深刻な腸閉塞を起こす。1992年に本発明者の技術を保ちながら、ハモッシュと同僚 (Hamosh et al.)、(1992年)、アメリカンジャーナルオブヒューマンジェネティク (Am. J. Hum. Genet.)、51巻、p. 245) は、二つの異なる C F T R 突然変異体のデルタ F 508 と G 551 D にホモ接合な患者は、二つの同一の変異誘発遺伝子をヘテロ接合型で受け継いだ患者に比べ、深刻な膵臓の関与と腸機能障害を持つことを見いだした。突然変異を起こすデルタ F 508 と G 551 D 疾患をコード化するヌクレオチドは、それぞれエクソン 10 とエクソン 11 に位置しているため、ホモ接合患者に比べて完全に正常な C F T R 分子の合成により、疾患減弱がヘテロ接合になることが本発明者の技術で得られる。

【0191】

実施例 7 新規生化学経路による哺乳類 H D ^(C) モデルとしての糖尿病

糖尿病はインスリン分泌障害又はその作用に対する妨害のため血糖レベルが適切に制御出来ない一般的な重病である。多くの機構的に異なる形の糖尿病がある。1型糖尿病 (若年の糖尿病) では、インスリンを分泌する膵臓内細胞の島細胞への免疫攻撃のためにインスリン放出が損なわれる。グルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D 65) は1型糖尿病の免疫系が標的とする主要島細胞自己抗原をコード化する。

【0192】

代替え対立遺伝子型のアミノ酸のグルタミン酸デカルボキシラーゼ酵素での異なるアミノ酸をコード化したヌクレオチド変化物のエクソン位置を表4に詳述する。コード領域の配列変異体は N C B I データベースで検索した。表4に示すようにエクソン1はアミノ酸位12でルギニン又はグリシンをコード化するヌクレオチドの変化物を含む。一方エクソン4はアミノ酸位124でアスパラギン又はリシンのいずれかと同様に、位置153でグルタミン又はプロリンをコード化するヌクレオチド変化物を含む。位置232の代替えアミノ酸のグルタミン酸又はグリシンがエクソン6内のヌクレオチド差異物によりコード化され、位置286のアルギニン又はリシンはエクソン8内のヌクレオチド変化物によりコード化され、位置326のアラニン又はグリシンのいずれかはエクソン10内のヌクレオチド変化物によりコード化されることを表3は示す。

【0193】

代替えアミノ酸をコード化し、エクソン1、エクソン4、エクソン6、エクソン8又はエクソン10に含まれるヌクレオチド配列差異物の分布は、表4で述べた異なる対立遺伝子型酵素内の任意の二つにヘテロ接合な被験者のハイブリッド型グルタミン酸デカルボキシラーゼ産生実現に必要な構造的基準を満たす。例えばエクソン6とエクソン8に位置するヌクレオチド差異物だけによりコード化出来る代替えアミノ酸を参照して、アミノ酸位232と286で (a) グルタミン酸/アルギニン、(b) グルタミン酸/リシン、(c) グリシン/アルギニン及び (d) グリシン/リシンの組み合わせが、この新規生化学経路に従い形成する。これら組み合わせの内二つが野生型酵素を含む一方、他の二つはハイブリッド型を含む。

表4 代替えグルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D 65) 対立遺伝子アミノ酸差異物をコード化するヌクレオチド変化物のエクソン位置

【表 4】

アミノ酸位	エクソン	アミノ酸代替物
12	1	(R) アルギニン
12	1	(G) グリシン
124	4	(N) アスパラギン
124	4	(K) リシン
153	4	(Q) グルタミン
153	4	(P) プロリン
232	6	(E) グルタミン酸
232	6	(G) グリシン
286	8	(R) アルギニン
286	8	(K) リシン
326	10	(A) アラニン
326	10	(G) グリシン

10

【0194】

実施例 8 自己抗体誘発での G A D 6 5 ヘテロ接合性の役割

G A D 65 自己抗体は疾患発症前に 1 型糖尿病を患う患者の血清と同様に、低レベルではあるがその無症候兄妹の血清で検出できる。

20

【0195】

本発明者の知見と構造的基準を満たす G A D 6 5 対立遺伝子のヘテロ接合性により、G A D 6 5 に対する免疫反応を増強するハイブリッド型 G A D 6 5 が産生できるという仮説を保ちながら、自己抗体レベルは非 1 型糖尿病被験者でさえ G A D 6 5 遺伝子型に従い変化する必要がある。ブーチン等 (Butin, et al.) による、(2003 年)、プロエスバイオロジー (PLoS Biol.)、1 巻、p. 68 の最新の包括的研究により、G A D 6 5 自己抗体レベルは G A D 6 5 対立遺伝子にヘテロ接合な被験者の方が、同一 G A D 6 5 対立遺伝子にホモ接合な同一グループ被験者に比べ遙かに高いことが確認された。これらの知見は本発明者の構造的基準を満たす異型の対立遺伝子にヘテロ接合な被験者の新規生化学経路により形成した新規ポリペプチド又はタンパク質は、同一 G A D 6 5 対立遺伝子にホモ接合な被験者に比べて、より容易に自己抗体を合成するという本発明者の主張を強く支持する。

30

【0196】

一方熟年で起こりその一部は肥満と関連する型の糖尿病は、自己免疫プロセスでは起こらない。この型の糖尿病は 2 型糖尿病と云われる。染色体 2 に位置する最も一貫して認識されている 2 型糖尿病の候補遺伝子は、カルパイン 10 (C A L P-10) である。C A L P-10 の変異型は 2 型糖尿病発生の最大の危険と関連するが、この遺伝子と 2 型糖尿病の発生との間の関係を説明する C A L P-10 変異型は発見されていない。C A L P-10 と 2 型糖尿病発生のし易さと関連する H D モデルは、ハイブリッド酵素を新規生化学経路経由でヘテロ接合子孫に形成するのに必要な構造的基準を満たす L 3 4 V、T 5 0 4 A、R 5 5 5 C 及び V 6 6 6 I のような多くの異なる対立遺伝子型の C A L P-10 が同定されたという知見 (エバンス等 (Evans, et al.)、アメリカンジャーナルオブジェネティック (Am. J. Genet.)、69 巻、p. 544 (2001 年)) により強く支持される。このモデルを保ちながら 2 型糖尿病発生のし易さの増加は、異なる対立遺伝子型の C A L P-10 とのホモ接合性より、むしろヘテロ接合性と関連することが示された (コックス等 (Cox, et al.)、(2001 年)、ヒューマンモレキュラージェネティック (Hum. Mol. Genet.)、10 巻、p. 2301; コックス等 (Cox, et al.)、(2004 年)、ダイベテス (Diabetes)、53 巻、p. 19 参照)。

40

【0197】

50

インスリン分解酵素（IDE）はゲノム走査により染色体 10 に位置することが見いだされた他の強力な候補 2 型糖尿病感受性遺伝子である。IDE はインスリンのタンパク質分解が、恐らくインスリン応答の終了の一部として関与する。C A L P - 10 のように変異型の IDE を起こす疾患は発見されていない。

【0198】

IDE 内の異なるアミノ酸をコード化するヌクレオチド変化物のエクソン位置を表 5 に示す。コード配列変異体は N C B I データベースを検索した。表に示すようにエクソン 3 は、位置 298 で代替えアミノ酸のフェニルアラニン又はロイシンをコード化するヌクレオチド配列差異物を含む。更にアミノ酸のロイシン又はフェニルアラニンは、アミノ酸位 582 でエクソン 5 内に位置するヌクレオチド変化物によりコード化できるか、又はアミノ酸位 854 のセリン又はグリシンがエクソン 11 内のヌクレオチド差異によりコード化できる。アスパラギン又はアスパラギン酸はアミノ酸位 947 でエクソン 20 に含まれる配列変異体によりコード化できる。

【0199】

位置 298、582、845 及び 947 の代替えアミノ酸をコード化し、それぞれエクソン 3、エクソン 5、エクソン 11 及びエクソン 20 に位置するヌクレオチド配列差異物の分布は、表 4 に示した代替え対立遺伝子のいずれか二つにヘテロ接合な被験者のハイブリッド型 I D E の合成に必要な構造的基準を満たす。例えばエクソン 11 とエクソン 20 でだけコード化される対立遺伝子を参照すると、位置 845 と 947 でのアミノ酸の組み合わせとしては、(a) セリン／アスパラギン、(b) セリン／アスパラギン酸、(c) グリシン／アスパラギン及び (d) グリシン／アスパラギン酸が挙げられる。これら組み合わせの内二つは野生型酵素を反映する一方、他の二つはハイブリッド型の酵素を含む。

表 5 代替え I D E 対立遺伝子でアミノ酸差異物をコード化したヌクレオチド変化物のエクソン位置

【表 5】

アミノ酸位	エクソン	アミノ酸代替え物
298	3	(F) フェニルアラニン
298	3	(L) ロイシン
582	5	(L) ロイシン
582	5	(F) フェニルアラニン
845	11	(S) セリン
845	11	(G) グリシン
947	20	(N) アスパラギン
947	20	(D) アスパラギン酸

【0200】

実施例 9 新規生化学経路による哺乳類 H D モデルとしての血栓塞栓症

ループス抗凝固因子を発生する全身性エリテマトーデス（S L E）に罹った患者は血栓塞栓症に罹りやすい。血栓塞栓症の発生は血液凝固系の不可欠部である血小板の不適切な活性化によると考えられる。S L E 患者では血小板がその表面の F c ガンマ I I a 受容体と結合した免疫複合体の循環によるか、又はこれらに対抗する自己抗体により活性化される。

【0201】

最近の研究の結果（シャルモザー等（Schallmoser et al.）、（2005 年）、スラン

ボシスヘマスタシス (Thrombosis Haemostasis)、93巻、p. 544) により、ループス抗凝固因子を有する患者が代替え対立遺伝子型のFcガンマI Iaにヘテロ接合である場合には、その患者は血栓塞栓症発生がより起こり易いことが示された。

【0202】

代替え対立遺伝子形のFcガンマI Iaの異なるアミノ酸をコード化するヌクレオチド変異でのエクソン位置を表6に示す。

【0203】

コード配列変異体はNCBIデータベースを検索した。表6に示すようにエクソン1はFcガンマI Iaのアミノ酸位61でアルギニン又はグルタミンのいずれかをコード化出来る一方、エクソン2はアミノ酸位138でバリン又はメチオニンをコード化し、且つアミノ酸位165でアルギニン又はヒスチジンのいずれかをコード化出来る。エクソン3はアミノ酸位272でプロリン又はロイシンをコード化できる。

【0204】

ここに記載の該発明に従うと位置61、138、165及び272でのアミノ酸の組み合わせにより、最低で二個の野生型タンパク質と最低で少なくとも六個のハイブリッドタンパク質を形成できる。

表6 代替えFcガンマI Ia対立遺伝子でのアミノ酸差異物をコード化するヌクレオチド変化物のエクソン位置

【表6】

アミノ酸位	エクソン	アミノ酸代替え物
61	1	(R) アルギニン
61	1	(Q) グリシン
138	2	(V) バリン
138	2	(M) メチオニン
165	2	(R) アルギニン
165	2	(H) ヒスチジン
272	3	(P) プロリン
272	3	(L) ロイシン

【0205】

実施例10 HVでの新規生化学経路の役割を支持する植物モデル

カタラーゼ1 (Cat-1) は植物での過酸化水素崩壊で重要な役割を果たす酸化還元型酵素である。トウモロコシでは少なくとも六つの異なる対立遺伝子型Cat-1が同定され、その大部分はアミノ酸組成が異なる。

【0206】

1972年にハイブリッド型のCat-1が二つの異なる対立遺伝子型のCat-1にヘテロ接合な植物が同定された (スキャンダリオス等 (Scandalios et al.)、(1972年)、アーカイブバイオケミストリーバイオフィジクス (Arch. Biochem. Biophys.)、153巻、p. 695)。ハイブリッドCat-1酵素はホモ接合な親型のいずれかに比べ、一連の増強された生化学的物性を持つことが示された。

【0207】

新規生化学経路により重合体型酵素の形成に依存しない野生型に比べ、生化学的物性が増強されたハイブリッドCat-1分子形成に関し真実性のある説明が提供される。

【0208】

実施例 1 1 H Vでの新規生化学経路の役割を支持する昆虫モデル

オクタノールデヒドロゲナーゼ (odh) はウスグロショウジョバエ及び他のハエに見られる酵素をコード化する。これは長鎖アルコールの代謝が関与する。二つの構造的に異なる酵素odhで、電気泳動移動度の差異に基づくFとSが同定された。1972年にウィルス (Wills)、ニコルス (Nichols) (プロシーディングオブナショナルアカデミーオブサイエンス、ユーエスエイ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、69巻、p. 323 (1972年)) は、二つの構造的に異なるodhのそれぞれでのヘテロ接合性が、オクタノール含浸培地で発生のハエ生存に雑種的作用を果たすことが示された。雑種ヘテロ接合odhハエは各代替型odhにそれぞれホモ接合性なその親のいずれにも見られない新規構造型の酵素を有する。新規生化学経路によりこの酵素の多量体化に依存しないヘテロ接合ハエでの新規構造型odhの形成に関し真実性のある説明が提供される (シン等 (Singh et al.)、ジェネティックス (Genetics)、80巻、p. 637 (1975年) 参照)。

【0209】

実施例 1 2 ハイブリッドアルギニノコハク酸分解酵素 (ASL) 分子の同定

以下に概説するように活性アルギニノコハク酸分解酵素 (ASL) は、異なる変異誘発遺伝子それぞれの野生型コード化エクソンを同一mRNA分子へ新規に同定の生化学的経路により含めることで影響を受けた親の子孫に産生出来ることを証明することが可能である。

【0210】

以前の研究によりASL (D87G) とASL (Q286R) のような不活性ASL変異体の組み合わせがヘテロ接合型で受け継いだ場合には、活性は一部保持されることが示された。それ故二つの不活性変異誘発遺伝子型ASLのそれぞれを受け継いでいることが証明された被験者の線維芽細胞又は肝臓からmRNAが単離出来る。次いでそれぞれのエクソンにまたがるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて全mRNAを逆転写PCRに付すことができる。次いでこれらの領域を含む逆転写PCR産物をクローンし、配列決定する。

【0211】

ASL (D87G) / (Q286R) として遺伝子同定した被験者の逆転写PCR産物で産生したクローンの約85%では、先ずASLの両アレン発現とシス構造のエクソンが確認されるであろう。しかしクローンの約15%の挿入断片配列は、同一クローンの二つの親対立遺伝子のそれぞれによる遺伝子を含み、その結果酵素活性を説明する約15%の野生型酵素を産生するであろう。

【0212】

実施例 1 3 ハイブリッドGAD65分子とGAD65自己抗体産生との関連

全mRNAは1型糖尿病を患う患者から得た膵臓組織の島細胞から抽出できる。患者が非同義アミノ酸をコード化する異なるエクソンでのヌクレオチド変化物を有するGAD65対立遺伝子にヘテロ接合な場合 (表3参照) には、その患者は彼又は彼女の血液に高力価のGAD65自己抗体を有するであろう。

【0213】

次いで膵臓mRNAの全てを患者のGAD65遺伝子型に従い、エクソン1、エクソン4、エクソン6、エクソン8又はエクソン10にまたがるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、逆転写PCRに付すことが出来る。

【0214】

クローンの約85%の挿入断片配列としては、二つの対立遺伝子型のそれぞれの両アレン発現とシス構造のエクソンが確認されることが予期される。クローンの別の15%の配列は、上に定義の異なる対立遺伝子型GAD65にヘテロ接合で、その血液中に循環GAD65自己抗体を有する1型糖尿病を患う患者の島細胞で、ハイブリッド型GAD65が合成されることを確認する挿入断片を含むことが予期されるであろう。

【0215】

研究中的子孫が上に定義の対立遺伝子を有する遺伝子を受け継いだことがわかり、その

10

20

30

40

50

遺伝子が発現される組織又は細胞の同定された場合には、全種に同一実験的原理が適用できる。

【0216】

上に含まれる方法論は実施例にしか過ぎないことを意味し、当業者になじみのいずれの他技術又は実験的プロトコルの使用が排除されるものではない。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2006/001065
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. C12Q 1/68 (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) 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) AGRICOLA, WPIDS, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, BIOTECHABS, USPATFULL, EPFULL: hybrid vigour, hybrid debility, allele, polymorphism, polymorphism, variant, mutation, snp, microsatellite, exons		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2005/075668 A1 (RED RABBIT PTY LTD) 18 August 2005 Whole document (note claims 1-13, 22-26 are identical to current claims 1-13, 17-20; see also page 51; line 19 to page 54, line 19)	1-15, 23-24, 26-27
A	WO 2000/042838 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) 27 July 2000 Whole document (especially pages 10, 17, 35-36 and claim 15)	
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ 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 "T" 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 10 August 2006		Date of mailing of the international search report 19 SEP 2006
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer Jamie Turner Telephone No : (02) 6283 2071

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2006/001065

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **16-22, 25, 28**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 16-22, 25 and 28 are not considered to be limited to the technical features of the invention. As discussed throughout the specification, the present invention hinges on the discovery that hybrid vigour and hybrid debility traits can be generated in heterozygous offspring in a biochemical pathway that incorporates exons from each of the two parental allelic transcriptional units into the same mature mRNA molecule. Because claims 16-22, 25 and 28 do not incorporate this feature, they are not considered limited to the technical features of the invention.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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. ☐ 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.:

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/AU2006/001065

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO	2005075668				
WO	2000042838	AU	26213/00	CA	2358509
		HU	0200319	MX	PA01007325
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4B024 AA08 AA10 BA79 BA80 CA01 CA11 DA01 DA02 EA04 GA11
HA08 HA11 HA17
4B063 QA01 QA13 QA17 QA18 QA20 QQ02 QQ04 QQ08 QQ09 QQ12
QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42 QR50 QR55 QR62 QR72
QR73 QR77 QR78 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX02 QX10