

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4750285号
(P4750285)

(45) 発行日 平成23年8月17日(2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年5月27日(2011.5.27)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
A 01 H 5/00	(2006.01)	A 01 H 5/00	A
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 3

請求項の数 12 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2000-615766 (P2000-615766)
 (86) (22) 出願日 平成12年5月4日 (2000.5.4)
 (65) 公表番号 特表2002-542828 (P2002-542828A)
 (43) 公表日 平成14年12月17日 (2002.12.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2000/012380
 (87) 國際公開番号 WO2000/066743
 (87) 國際公開日 平成12年11月9日 (2000.11.9)
 審査請求日 平成19年4月27日 (2007.4.27)
 (31) 優先権主張番号 60/132,697
 (32) 優先日 平成11年5月4日 (1999.5.4)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 微生物の受託番号 ATCC 203981

(73) 特許権者 508233559
 ケンタッキー バイオプロセシング、リミ
 ティド ライアビリティ カンパニー
 アメリカ合衆国、ケンタッキー 4230
 3, オーエンスボロ、エアパーク ドライ
 ブ 3700
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敏
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ウイルス発現ベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

変更ウイルス移動タンパク質及び変更 126 / 183 レプリカ - ゼ複合体をコードする
、配列番号 2 全体を含む単離核酸配列。

【請求項 2】

前記変更 126 / 183 レプリカ - ゼ複合体が、その変更レプリカ - ゼ複合体を発現するウイルスに含まれるトランスジーンの安定性を高める、請求項 1 に記載の単離核酸配列。

【請求項 3】

前記変更移動タンパク質が、その変更移動タンパク質を発現するウイルス内に含まれるトランスジーンの安定性を亢進する能力を高める、請求項 1 又は 2 に記載の単離核酸配列。

【請求項 4】

A T C C 受託番号第 203981 号に寄託された B S G 1057 と命名された、配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有する変更ウイルス移動タンパク質をコードする核酸配列を含むウイルス・ベクター。

【請求項 5】

対照のウイルス・ベクターと比較して、ベクター内に含まれるトランスジーンを安定させる高められた能力を示す、請求項 4 に記載のウイルス・ベクター。

【請求項 6】

10

20

前記ベクターがタバコ・モザイク・ウイルス・ベクターである、請求項5に記載のウイルス・ベクター。

【請求項 7】

前記トランスジーンが非ウイルス遺伝子である、請求項6に記載のウイルス・ベクター。

【請求項 8】

前記非ウイルス・トランスジーンが、膜タンパク質、細胞基質タンパク質、分泌タンパク質、核タンパク質、及びシャペロン・タンパク質から成る群から選ばれるタンパク質をコードする、請求項7に記載のウイルス・ベクター。

【請求項 9】

請求項4～8の何れか一項のベクターによって形質転換された細胞。

10

【請求項 10】

植物細胞である、請求項9の細胞。

【請求項 11】

請求項4～8の何れか一項のウイルス・ベクターを包むトランスジェニック植物。

【請求項 12】

配列番号2の単離核酸配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願のクロス・リファレンス

20

本願は、援用する継続中の1999年5月4日に出願されたプロビジョナル米国特許出願第60/132,697の優先権の利益を主張する。

【0002】

技術分野

この発明は、植物ウイルス学の分野に在る。とりわけ、本発明は、変更ウイルス移動タンパク質をコードする核酸配列の合成、上記タンパク質を発現するウイルスベクターの構築、及び上記ウイルス・ベクターに感染した宿主植物の生成に関する。前記ウイルス・ベクターは、局所的及び全身性の宿主への素早い侵襲を可能にし、そして着目のトランスジーンの安定した発現を可能にする。

【0003】

30

本発明の背景

ここ15年間、植物での外来遺伝子の発現においてかなりの進歩があった。外来タンパク質は、植物の改良又は抽出後に使用するタンパク質の生産のために現在日常的に多くの植物種において産生されている。植物の遺伝子操作のためのベクターは、いくつかの天然植物ウイルスから抽出されてきた。特定のタンパク質の産生のための、ウイルス・ベースのベクターを用いる植物内での外来遺伝子の一過性の発現は、いくつかの利点をもつ。植物ウイルスの産物は、植物において最も多く産生されるタンパク質の一つである。しばしばウイルス遺伝子の産物は、ウイルス複製の間は植物細胞内で産生される主なタンパク質となる。多くのウイルスは、最初の感染部位から植物のほとんど全ての細胞への全身的な(stemic)移動が可能である。それらの理由により、植物ウイルスは、植物内での外来遺伝子のための効率的な一過性の発現ベクターへと開発してきた。多細胞植物のウイルスが比較的小さいのは、おそらく植物全体の全身性感染において隣接する細胞へのウイルスの移動をもたらす経路の大きさ制限の理由からであろう。植物発現ベクターが構築される前記植物ベクターの一つがTMV(タバコ・モザイク・ウイルス)である。TMVはタバコウイルス群の基準メンバーである。TMVは、一本鎖RNA分子の周りに巻きついた約2000ユニットの単キャプシド・タンパク質から成る直径4nmの中空管であって約300×18nmの直線管状ウイルス粒子をもつ。ウイルス粒子は、重量にして95%のタンパク質と5%のRNAである。TMVのゲノムは、5つのラージORFsを含む6395ヌクレオチドの一本鎖RNAで構成される。それぞれの遺伝子の発現は、独立して調節されている。ウイルスRNAは、126kDaのレプリカ・ゼ・サブユニット及び約5%の時間にあるアンバー終止コドンの読み過ごすことによって産

40

50

生される183kDaレプリカ - ゼ・サブユニットをコードする、5' 遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA) として使用できる。上記内在遺伝子の発現は、複製の間に產生される3' コターミナル・サブゲノムmRNAの合成を指令するマイナス・センスRNA上の異なるプロモーターによって制御されている。タバモウイルスの遺伝子発現及びライフ・サイクルの詳細な記載を、とりわけDawson and Lehto, Advances in Virus Research 38:307-342(1991)において見ることができる。

【0004】

従って、植物の遺伝子操作のための新規の、そして改良されたベクターを提供することは、科学的及び商業的に重要である。

【0005】

10

発明の詳細

本発明の主要な側面は、宿主植物内におけるトランスジーンの安定した発現に作用する変更移動タンパク質及び変更126 / 183ウイルス・タンパク質を発現する組換えウイルス・ベクターの構築である。

【0006】

したがって、本発明は、配列番号5又は6に示すアミノ酸配列を有する変更ウイルス移動タンパク質並びに変更126 / 183ウイルス・タンパク質をコードする単離核酸配列を提供する。一つの側面において、前記単離核酸配列は、配列番号3又は4に示した配列と基本的に同一であり、そして図1Aに示したとおり5213位にチミン(T)又はウラシル(U)を、さらに5303位にグアニン(G)を含む。他の側面において、前記単離核酸配列は、配列番号3又は4に示す配列と同一である。前記30K移動タンパク質の改変及び前記126 / 183ウイルス・タンパク質の変更は、ウイルス・ベクターに含まれるトランスジーンの安定性を亢進する高められた能力を生じる。

20

【0007】

別の態様において、本発明は、配列番号5又は6に示すアミノ酸配列を有する変更ウイルス移動タンパク質並びに変更126 / 183ウイルス・タンパク質をコードする核酸配列を含むウイルス・ベクターを提供する。一つの側面において、前記ウイルス・ベクターは、対照ウイルス・ベクターと比較してベクター内に含むトランスジーンの安定性について高められた能力を表す。好ましくは、前記ベクターは、タバコ・モザイク・ウイルス・ベクターである。特に好ましいベクターは、B S G 1 0 5 7と称される(1999年4月28日に受託番号第203981号としてATCCに寄託された)。

30

【0008】

この態様の別の側面において、前記ウイルス・ベクターは、着目のトランスジーンを含む。好ましくは、トランスジーンは、膜タンパク質、細胞基質タンパク質、分泌タンパク質、核タンパク質、及びシャペロン・タンパク質から成る群から選ばれるタンパク質をコードする非ウイルス遺伝子である。

【0009】

本発明は、当該ウイルス・ベクターによって形質転換された細胞をも提供する。前記形質転換された細胞は、動物及び植物のものでありうる。好ましくは、前記細胞は、植物細胞である。本発明は、前記ウイルス・ベクターを含むトランスジェニック植物をさらに提供する。好ましいトランスジェニック植物は、例えばニコチアナ・ベンサミアナ(Nicotiana benthamiana)又はニコチアナ・タバコム(Nicotiana tabacum)でありうるが、他のものが当業者により容易に代用されうる。

40

【0010】

本発明の実行様式

この開示の全体にわたって、各種刊行物、特許、及び公開特許明細書が、引用法により示す。それらの刊行物、特許、及び公開特許明細書の開示は、この発明に関する技術様相のより完全な記載のために、本明細書により本開示に援用される。例えば、植物への全身的感染及びそれらからの異種タンパク質の発現のためのウイルス植物ベクターの構築及びそれらの使用についての一般的な教示は、米国特許第5,316,931号；第5,977,438号；第5,88

50

9,191号；第5,889,190号；第5,866,785号；及び第5,816,653号に開示され、全ての開示が本明細書により援用される。

【0011】

一般的な技術：

本明細書の実施には、別に指示されない限り、本技術分野の技術の範囲内の免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノム科学、及び組換えDNAの慣用技術を必要とする。例えば、PLANT VIROLOGY, 3rd edition(1991); Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition(1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.Ausubel, et al.eds., (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH(M.J.MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds.(1995)), Harlow and Lane, eds.(1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE(R.I.Freshney, ed.(1987))を参照のこと。

10

【0012】

明細書及びクレーム中で用いられるとき、単数形「a」、「an」、及び「the」は、その文脈が明らかに別のことを指示しない限り複数のものをも含む。例えば「a cell」は、それらの混合物を含めて、複数の細胞を含む。

【0013】

定義：

「植物細胞(plant cell)」は、プロトプラスト及び細胞壁から成る植物の構造的、そして生理学的単位を指す。

20

【0014】

「プロトプラスト(protoplast)」は、細胞培養、植物組織又は植物全体において再分化する可能性をもつ、細胞壁をもたない単離された細胞である。

【0015】

「宿主(host)」は、ベクター又はウイルスの核酸の複製が可能であり、さらにウイルス・ベクター又はウイルスの核酸を含むウイルスによって感染させることが可能である細胞、組織又は生物体を包含する。この用語は、原核生物及び真核生物の細胞、器官、組織、生物体又は適合するそれらの細胞外抽出物を含むことが意図される。好ましい宿主細胞は、植物細胞である。

30

【0016】

用語「感染(infection)」は、転移させる工程又はウイルスの核酸が複製され、ウイルスのタンパク質が合成され又は新しいウイルス粒子が組み立てられるところのその核酸を宿主に転移させるウイルスの能力を指す。

【0017】

タバコ・モザイク・ウイルスの「移動タンパク質(movement protein)」は、植物内におけるRNAレプリコン又はウイルスの細胞間移動のために必要とされる非キャプシド・タンパク質である。

用語「核酸配列(nucleic acid sequence)」、「ポリヌクレオチド(poly nucleotide)」、「ヌクレオチド(nucleotide)」、及び「オリゴヌクレオチド(oligonucleotide)」は、互換性をもって使用される。それらは、あらゆる長さのヌクレオチドの重合体の形状、デオキシリボ核酸又はリボ核酸のいずれか、それらのアナログを指す。ポリヌクレオチドは、さまざま三次元構造をもち、既知または未知のさまざま機能を実行しうる。以下の：遺伝子または遺伝子断片のコードまたは非コード領域、連鎖解析から定義される遺伝子座(loci)(遺伝子座(locus))、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスクルペーション、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、あらゆる配列の単離されたDNA、あらゆる配列の単離されたRNA、核酸プローブ、及びプライマーは、制限することのないポリヌクレオチドの例である。ポリヌクレオチドは、修飾したヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド・アナログを含みうる。存在するならば、ヌクレオチ

40

50

ド構造に対する修飾は、前記重合体の組み立て前または後になされうる。前記ヌクレオチドは、非ヌクレオチド成分により妨げられうる。ポリヌクレオチドは、重合の後、例えば標識化成分との複合体形成によりさらに修飾されうる。

【0018】

「遺伝子 (gene)」は、転写及び翻訳された後に特定のタンパク質をコードすることが可能である少なくとも一つのオープン・リーディング・フレームを含むポリヌクレオチドを指す。

【0019】

本明細書で用いられる場合、「発現 (expression)」は、ポリヌクレオチドをmRNAに転写する過程及び/又はそれに引き続いて(「転写産物 (transcript)」ともいわれる)転写されたmRNAをペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳する過程を指す。前記転写産物及び前記コードされるポリペプチドは、まとめて遺伝子産物といわれる。前記ポリヌクレオチドがゲノムDNA由来の場合、発現には真核生物細胞におけるmRNAのスプライシングが含まれるであろう。

10

【0020】

ポリヌクレオチドにおいて、「直鎖状配列 (linear sequence)」又は「配列 (sequence)」は、ポリヌクレオチドにおける5'から3'方向において一定の順番のヌクレオチドであって、ここで前記配列においてお互いに隣り合っている残基はそのポリヌクレオチドの一次構造において隣接している。

20

【0021】

ヌクレオチドの直鎖状配列は、両配列が同じ相補的ポリヌクレオチドと二重鎖を形成するハイブリッド形成が可能である場合、他の直鎖状配列と「本質的に同一 (essentially identical)」である。非常なストリンジエンシーの条件下でハイブリッド形成する配列がより好ましい。ハイブリッド形成反応は、前記ヌクレオチド配列の挿入、欠失、及び置換を受け入れると理解される。したがって、ヌクレオチドの直鎖状配列は、たとえいくつかのヌクレオチド残基が正確に一致又は整列させなくても本質的に同一であることができる。一般的に、約40ヌクレオチドの長さの本質的に同一な配列は、約30において $10 \times$ SSC (0.15M塩化ナトリウム、15mMクエン酸緩衝液) 中でハイブリッド形成する；好ましくは、それらは約40において $6 \times$ SSC中でハイブリッド形成する；より好ましくは、それらは約50において $6 \times$ SSC中でハイブリッド形成する；さらにより好ましくは、それらは約60

30

において $6 \times$ SSC中で又は約40において $0.5 \times$ SSC中で又は約30において50%ホルムアミドを含む $6 \times$ SSC中でハイブリッド形成する；よりいっそう好ましくは、それらは40以上において50%以上のホルムアミドが存在する $2 \times$ SSC以下の濃度のSSC中でハイブリッド形成する。前記試験の厳密さは、部分的に前記ポリヌクレオチドの長さの関数であると理解されうる；このことから同じ相同性をもつより短いポリヌクレオチドはより低いストリンジエンシーの下、試験されるべきであり、それぞれに応じて条件が調節される。ハイブリッド形成のストリンジエンシー、配列一致の程度、そしてポリヌクレオチドの長さの間の関係は、本分野において知られ、そして標準式により算出されうる；例えばMeinkoth et al.を参照のこと。本発明のものと一致するか又はより近くに整列する配列は、同様に好ましい。一般に、本質的に同一な配列は、相同領域の整列後、お互いに少なくとも約50%同一である。好ましくは、前記配列は少なくとも約60%同一である；より好ましくは、それらは少なくとも約70%同一である；より好ましくは、それらは少なくとも約80%同一である；より好ましくは、それらは少なくとも約90%同一である；さらにより好ましくは、それらは少なくとも約95%同一である；いっそうより好ましくは、前記配列は少なくとも約100%同一である。

40

【0022】

ポリヌクレオチド配列が本質的に同一であるかどうかを決定するに際し、それと比較される前記ポリヌクレオチドの機能を保存する配列が特に好ましい。機能は、さまざま基準、例えば標的ポリヌクレオチドとのハイブリッド形成能及び前記ポリヌクレオチドが同一の又は本質的に同一のポリペプチドをコードするかどうかによって確立されうる。したが

50

つて、コードされるポリペプチドにおける非保存的置換を引き起こすヌクレオチド置換は、好ましくは終止コドンを生じるヌクレオチドの置換である；コードされるポリペプチドにおける保存性置換を引き起こすヌクレオチド置換はより好ましく、そしてヌクレオチド配列が一致することはさらに好ましい。前記ポリペプチド内の挿入又は欠失をもたらす前記ポリヌクレオチドにおける挿入又は欠失は、相がずれて翻訳される下流のコード領域をもたらすものよりも好ましい。

【0023】

ポリヌクレオチドに用いられる用語「ハイブリッド形成 (hybridize)」は、ハイブリッド形成反応においてヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化させる複合体を形成するポリヌクレオチドの能力を指す。前記水素結合は、ワトソン-クリック型塩基対、フーゲスティーン型結合又はその他の配列固有の様式で起こりうる。前記複合体は、2本の鎖が形成する二重鎖構造、3本以上の鎖が形成する多鎖複合体、1本での自己ハイブリッド形成鎖又はそれらのいくつかの組合せを含みうる。

【0024】

細胞性タンパク質に用いる用語「細胞基質の (cytosolic)」、「核の (nuclear)」、「分泌 (secreted)」は、その細胞性タンパク質が主の局在している細胞外及び/又は細胞内の位置を特定する。ある種のタンパク質「シャペロン (shaperons)」は、細胞の基質と核の間を縦横に転移することができる。

【0025】

「対照 (control)」は、比較目的のための実験において用いられる他の対象又はサンプルである。例えば実験目的がウイルス・ベクターが保有する変更移動タンパク質が宿主への全身性侵襲において高められた能力を備えているかどうか確認する実験の場合、野生型の変更移動タンパク質（例えば図2に示す1037配列）を発現する対照ベクター（例えば図1-2に示すBSG1037）を用いることが一般的に好まれる。

「細胞株 (cell line)」又は「細胞培養 (cell culture)」は、細菌、植物、昆虫又は高等真核生物の細胞をインビトロにおいて育成又は維持することを意味する。細胞の子孫は、前記親細胞と(形態学的、遺伝子型的又は表現型的のいずれにおいても)完全に一致することはありえない。

【0026】

「ベクター (vector)」は、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、宿主細胞内にデリバリーされるポリヌクレオチドを含む組換えプラスミド又はウイルスを指す。前記デリバリーされるポリヌクレオチドは、遺伝子治療に関係するコードされた配列を含みうる。核酸分子、好ましくは自己複製する核酸分子を、挿入した核酸分子を宿主細胞内及び/又は間に転移させる。前記用語は、細胞内へのDNA又はRNAの挿入のために主に機能するベクター、DNA又はRNAの複製のために主に機能する複製ベクター、及びDNA又はRNAの転写及び/又は翻訳のために機能する発現ベクターを含む。前記機能を一つ以上提供するベクターも含まれる。

【0027】

「レプリコン (replicon)」は、適当な宿主細胞内においてそのポリヌクレオチドの複製をもたらす（一般的にori配列と表される）複製起点を含むポリヌクレオチドを指す。レプリコンの例は、クロモソーム（例えば核又はミトコンドリアのクロモソーム）と同様に、エピソーム（例えばプラスミド）を含む。

【0028】

「転写単位 (transcription unit)」は、遺伝子又はその断片の転写を導くことを可能にするDNAセグメントである。典型的には、転写単位は、転写される遺伝子又はDNA断片に使用できるように連結されたプロモーター及び前記転写される遺伝子又は断片の開始部位又は終止部位の上流又は下流のいずれかに位置した任意の調節配列を含む。

【0029】

本発明の核酸

本発明は、宿主植物内におけるトランスジーンの安定な発現に作用する変更移動タンパク

10

20

30

40

50

質及び変更126 / 183ウイルス・タンパク質を発現する組換えウイルス・ベクターを包含する。先に記載した移動タンパク質と異なり、前記変更タンパク質（104位のスレオニン残基をイソロイシンと置き換えた、そして134位のリジン残基をアルギニンと置き換えた、図2を参照のこと）は、2つのアミノ酸置換を含む。前記変更ウイルス・ベクターは、変更移動タンパク質を発現するウイルスに含まれるトランスジーンの安定性を亢進する高められた能力を示す。

【0030】

一つの態様において、本発明は、配列番号5又は6に示すアミノ酸配列を有する変更ウイルス移動タンパク質及び変更126 / 183ウイルス・タンパク質をコードする単離核酸配列を提供する。この態様の一つの側面において、前記移動タンパク質の単離核酸配列は、配列番号3に示す配列と本質的に同一であり、そしてそれは図1Aに示すとおり5213位にチミン（T）又はウラシル（U）残基を、そして5303位にグアニン（G）を含む。本明細書において用いられるとき、両配列が同じ相補的ポリヌクレオチドと二重鎖を形成するハイブリッド形成が可能である場合、ヌクレオチドの直鎖状配列は、もう一方の直鎖状配列と「本質的に同一」である。

【0031】

ハイブリッド形成は、さまざまな「ストリンジエンシー（stringency）」条件下で実施されることができる。適切な条件は、温度、イオン強度、インキュベート時間、反応混合物中の付加的な溶液、例えばホルムアミドの存在及び洗浄手順を含む。より高いストリンジエンシー条件は、より高い温度とより低いナトリウム・イオン濃度であり、安定なハイブリッド形成複合体の形成のためにハイブリッド形成要素間のより高い最小相補性が求められる上記の条件である。一般に、ストリンジエンシーの低いハイブリッド形成反応は、約40において6×SSC中で又は等価のイオン強度 / 温度の溶液において行われる。適度なストリンジエンシーのハイブリッド形成は、典型的には約50において6×SSC中で行われ、そしてストリンジエンシーの高いハイブリッド形成反応は、一般的に約60において6×SSC中で行われる。前記基本的に同一な核酸配列の本発明の態様は、望ましい構造的特徴（つまり、スレオニン₁₀₄をイソロイシンへ、そしてリジン₁₃₄をアルギニンへの置換の保存）に有意な変化をもたらさない保存性又は非保存性置換を含む変更移動タンパク質をコードする全ての配列を包含する。それらの該当する核酸配列を変更することによるポリペプチドの修飾は、本技術分野において日常的な操作である。

【0032】

互いに保存的に置換ができるアミノ酸残基は、グリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/スレオニン；リジン/アルギニン；及びフェニルアラニン/チロシンに限らず含む。コードされるアミノ酸配列が変化しない核酸配列の変化は、一般的に好まれる。

【0033】

前記組換えウイルス・ベクターのこの発明の態様は、先に記載したウイルス移動タンパク質をコードする核酸を含む。

【0034】

一つの態様において、核酸は、宿主植物内に導入される。好ましくは、前記核酸は、本技術分野において知られる技術、さらに好ましくはこれら全ての開示が本明細書によって援用される米国特許第5,316,931号；第5,977,438号；第5,889,191号；第5,889,190号；第5,866,785号；及び第5,816,653号に記載の技術を用いてウイルス核酸の代わりに導入される。前記組換えウイルス核酸は、前記宿主植物内において上記非天然配列の維持及び転写に安定である。

【0035】

BSG1057（配列番号2）は、BSG1037（配列番号1）の変異バージョンである。BSG1057及びBSG1037の完全配列を、図5及び図6に示す。BSG1037は、挿入物を維持する特性を改善された。

【0036】

10

20

30

40

50

これら2つのウイルス・ベクターの間の違いは、緑色蛍光タンパク質(GFP)リポーター遺伝子によって最もよく説明される。BSG1037とBSG1057の両者は、その緑色蛍光により低波長のUV光下で可視化されうるGFPを発現する。GFP活性の存在は、前記組換えウイルスが遺伝子を発現している細胞を確認するのに役立つ。

【0037】

BSG1037及びBSG1057を接種したニコチアナ・ベンサミアナを、接種後約4~5日で長波長UV光下で観察した。BSG1057ウイルスを接種した植物の葉におけるGFPスポットが、BSG1037ウイルスを接種した植物の葉におけるGFPスポットに比べ、顕著に大きいことは、上記1057ウイルスがBSG1037に比べて細胞間の移動が早いことを示唆している。

【0038】

10

BSG1037とBSG1057間の配列比較

1037と1057間の前記特定のヌクレオチドの変化を、以下の表中に列挙する。アミノ酸の変化を生じる前記ヌクレオチドの変化である場合において、変化が(一文字表記を用いて)記述される。

【0039】

【表1】

nt位	1037nt	1057nt	1037AA	1057AA	
1138(126/183)	A	G	E	G	
1268(126/183)	T	C		アミノ酸変化なし	
2382(126/183)	A	G	K	E	
3632(126/183)	G	A		アミノ酸変化なし	
5213(mp)	C	T	T	I	
5303(mp)	A	G	K	R	
5896(mp)	C	A		アミノ酸変化なし	

20

126/183は、前記126/183ウイルス・タンパク質を指す。

MPは、前記運動タンパク質を指す。

30

【0040】

本発明のベクターにより転写されるトランスジーンは、生物学的な存在物内で発現されるあらゆる遺伝子であることができる。トランスジーンの選択は、前記ベクターの意図される目的によっておおむね決定される。好ましくは前記トランスジーンは、膜タンパク質、細胞基質タンパク質、分泌タンパク質、核タンパク質、及びシャペロン・タンパク質から成る群から選ばれる非ウイルスの遺伝子である。

【0041】

40

この発明において実施された前記ベクターは、組換えクローニング法の使用及び/又は化学合成により得ることができる。莫大な数の組換えクローニング技術、例えばPCR、制限エンドヌクレオチドレアーゼ消化及びライゲーションは、本技術分野において周知であり、そのため本明細書で詳細に記載される必要はない。当業者は、本明細書より提供される又は本技術分野において利用できるあらゆる合成手段により、望ましいベクターを得るための公若しくは私有のデータベースの配列情報を使用することもできる。

【0042】

本発明の宿主細胞及び標的生物

本発明は先に記載したウイルス・ベクターにより形質転換した宿主細胞を提供する。前記宿主細胞は、動物又は植物でありうるが、植物宿主が好ましい。着目のトランスジーンを含むウイルス・ベクターは、エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム

50

、リン酸カルシウム、DEAE - デキストラン又は他の物質を用いるトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；及び（前記ベクターを感染作用物質と組合わせる）感染を含む多くの適切な手段によって好適な真核生物細胞内に導入されることができる。導入するベクターの選択は、しばしば前記宿主細胞の特徴に依存する。

【0043】

植物細胞のために、それらの一般的な方法に由来するさまざまな技術は、本技術分野において利用できる。例えば米国特許第5,316,931号；第5,977,438号；第5,889,191号；第5,889,190号；第5,866,785号；及び第5,816,653号を参照のこと。前記宿主細胞は、植物全体、単離した細胞又はプロトプラストの形態でありうる。植物細胞内にベクターを導入する方法の実例は、アグロバクテリウムを介した植物の形質転換、プロトプラストの形質転換、花粉内への遺伝子転移、生殖器内への注入及び未成熟胚への注入、葉の擦過、溶液中の擦過、高速水スプレー、その他の宿主の損傷、並びに組換えウイルスRNA又は組換え植物ウイルスを含む水を宿主の種子へ吸収させることを含む。当業者には明白であるが、これらの方法のそれぞれは、さまざまな利点と欠点を持つ。したがって、特定の植物種へのある特定の遺伝子導入法が、必ずしも他の植物種にとって最も効果的であるとはいえない。

【0044】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) を介した転移は、植物細胞内への遺伝子の導入に広く適用可能な系である。なぜなら前記DNAは植物全体の組織内に導入されることができ、プロトプラストから完全な植物への再生の必要を回避するからである。植物細胞内へのDNA導入のためのアグロバクテリウムを介した発現ベクターの使用は、本技術分野において周知である。この技術は、宿主細胞内にそのDNAの一部（前記T-DNA）を転移し、そこでそれがヌクレオチドDNAに組み合わせられることによりコロニーを形成するアグロバクテリウムの一般的な特徴を使用する。前記T-DNAは、25塩基対の長さの境界配列によって定義され、そしてこれらの境界配列の間のあらゆるDNAが同様に植物細胞に転移される。前記T-DNA境界配列間の組換え植物ウイルス核酸の導入が前記植物細胞への前記組換え植物ウイルス核酸の転移を生じる場合に、前記組換え植物ウイルス核酸は、複製され、そしてその植物全体に浸透移行的に広がる。アグロ感染は、ジヤガイモやせいもウイロイド (PSTV) (Gardner *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 6:221(1986))、CaV(Grimsley *et al.*, and Lazarowitz, S., *Nucl. Acids Res.* 16:229(1988))、ジギタリア・ストリーク・ウイルス (*digitaria streak virus*) (Donson *et al.*, *Virology* 162:248(1988))、ウィート・ドwarf・ウイルス (*wheat dwarf virus*)、及びトマト・ゴールデン・モザイク・ウイルス (TGMV) により達成される。したがって、感受性植物のアグロ感染は、先のウイルスのいずれかのヌクレオチド配列に基づいた組換え植物ウイルス核酸を含むウイルス粒子により達成されることができた。微粒子銃若しくはエレクトロポレーション又は本技術分野において知られる他の方法も使用されうる。

【0045】

全ての植物が本来アグロバクテリウムの宿主であるとは限らないため、他に取るべき方法、例えばプロトプラストの形質転換が前記宿主細胞内への当該ベクターの導入に用いられる。ある単子葉植物について、その植物のプロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム沈澱ポリエチレン・グリコール処理、エレクトロポレーション、及びそれらの処理の組合せに基づく方法の使用により達成される。例えばPotrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:169-177(1985); Fromm *et al.*, *Nature*, 319:791(1986); 及びCallis *et al.*, *Genes and Development*, 1:1183(1987)を参照のこと。これらの技術の別の植物種への適用可能性は、プロトプラストからのその植物種への再生の可能性に依存するであろう。プロトプラストからの穀類の再生のためのさまざまな方法は、本技術分野において知られている。プロトプラストの形質転換に加えて、微粒子銃が、植物宿主細胞内に本発明のウイルスをデリバリーするために他に取るべき、そして簡便な技術である。具体的に言うと、前記植物細胞は、多数の当該ベクターによりコートされた微粒子を照射されるであろう。DNAコートした微粒子の照射は、植物と動物のいずれにおいても安定な組換え体の產生に首尾よ

10

20

30

40

50

く用いられている（例えばSanford et al. (1993) *Methods in enzymology*, 217:483-509を参照のこと）。植物細胞内へのベクター導入に好適な微粒子は、典型的には金属でできており、好ましくはタンゲステン又は金でできている。それらの微粒子は、例えばバイオラド社製のもの（例えばバイオラド社のPDS-1000/He）で使用できる。当業者は、パラメーター、例えばヘリウム圧、コート粒子の量、マクロキャリアとストッピング・スクリーンの距離及びストッピング・スクリーンから前記目標までの飛程を修正することによりあらゆる植物に対し最適化できる微粒子銃のプロトコールを知っているであろう。

【 0 0 4 6 】

Zhou et al., *Methods in enzymology*, 101:433(1983)に記載のように花粉内への直接的なDNA転移によりベクターを植物内に導入することもできる。しばしば、植物細胞内への核酸導入技術は以下のようなものを含む：

(a) 手による接種。手による接種は、セライト（商標）又はカーボランダム（商標）（通常約1%）を加えた中性pH、低モル濃度のリン酸緩衝液を用いて行われる。1~4滴の前記調合液を葉の表面に滴下し、そして緩やかにこする。

(b) 苗床への機械的接種。苗床への機械的接種は、トラクター駆動の草刈り機がその葉を刈る間に前記ベクター溶液を（ガス駆出）噴霧することにより行われる。あるいは、前記苗床を、刈り、そして前記刈った葉の上に前記ベクター溶液を噴霧する。

(c) 一枚の葉 (single Leaves)への高圧噴霧。単独の植物 (Single plant)への接種は、狭い範囲で葉に噴霧することにより行われることもでき、(50psi (約344.7kPa)、前記葉から6~12インチ (15.24~30.48cm)の)指示された噴霧は、前記緩衝化したベクター溶液に約1%のカーボランダム（商標）を含む。

(d) 真空接種。接種は感染を促進するために宿主細胞を十分な減圧環境に晒すことにより達成されうる。

【 0 0 4 7 】

一旦、好適な宿主細胞内へ導入されれば、本技術分野において知られたいいくつかのアッセイを用いることで前記トランスジーンの発現を測定することができる。例えば、前記トランスジーンの転写されたセンス又はアンチセンス鎖の存在は慣用のハイブリッド形成アッセイ（例えばノザン・プロット分析）、增幅手順（例えばRT-PCR）、SAGE（米国特許第5,695,937号）、及び配列に基づく技術（例えば米国特許第5,405,783号；第5,412,087号；及び第5,445,934号を参照のこと）によって検出及び/又は定量化されうる。

【 0 0 4 8 】

前記トランスジーンの発現は、前記タンパク質産物を調べることによっても確認されうる。本技術分野におけるタンパク質の分析のためのさまざまな技術が利用できる。それらは、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベント検定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線検定法、（例えば金コロイド、酵素又は放射性物質標識を用いる）インサイチュウ・イムノアッセイ、ウエスタン・プロット分析法、免疫沈降検定法、免疫蛍光分析法、及びPAGE-SDSを含むが、これらに限ったものではない。

【 0 0 4 9 】

一般的に、前記タンパク質レベルの確認は、(a) ポリペプチドを含む生物学的サンプルの準備；(b) トランスジーン産物に反応性の抗体とサンプル中の成分の間に生じる免疫特異的な結合の量を計測することを含む（その免疫特異的な結合の量は、発現したタンパク質のレベルを示す）。前記トランスジーンのタンパク質産物を特異的に認識し、そして結合する抗体は、免疫検定法のために必要とされる。そしてそれらは、商業的な販売業者から入手されるか又は本技術分野における周知の方法で產生され、そしてスクリーニングされる。上記Harlow and Lane(1988)及び上記Sambrook et al.(1989)を参照のこと。試験タンパク質の前記サンプルは、前記真核生物の形質転換体（例えば植物細胞）又はそれらの子孫の均質化、そして場合により界面活性剤、好ましくは非還元型界面活性剤、例えばトリトン及びジギトニンを用いた前記試験タンパク質の可溶化により調製されうる。前記試験タンパク質が、前記検出抗体と相互作用しうる結合反応は、溶液中で又は固形の組織サンプル、例えば組織切片又は前記試験タンパク質が固定された固形担体上で行われうる

10

20

30

40

50

。前記複合体の形成は、本技術分野において知られる多くの技術により検出されうる。例えば、前記抗体は、標識して与えられ、そして未反応の抗体は前記複合体から除かれる；残留している標識の量により形成された複合体の量が示す。植物の形質転換体又はそれらの子孫からのサンプルにおける前記いくつかのアッセイを用いて得られた結果は、対照としての非形質転換起源のものと比較される。

【0050】

この発明の真核生物宿主細胞は、前記トランスジーンの発現を生じるのに適した条件下で育てられる。前記宿主細胞は、組換え生物、例えば本発明における形質転換DNAベクターを含む組換え植物を製造するためにも利用されうる。好ましい宿主細胞は、組織又は完全な生物に再生する性向を持つ。これらの好ましい宿主細胞の例は、本明細書により例示す10いくつかの植物細胞を含む。

【0051】

したがって、この発明は、当該ベクターを持つ組換え植物を提供する。単独の植物のプロトプラスト又はさまざまな外植片のいずれかからの植物の再生は、本技術分野において周知である。例えばMethods for Plant Molecular Biology, A. Weissbach and H. Weissbach, eds., Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1988)を参照のこと。この再生及び生育の工程は、形質転換体細胞及びシートの選択、形質転換シートの定着、そして土での前記苗の育成のステップを含む。

【0052】

アグロバクテリウム・ツメファシエンスにより導入された当該ベクターを含む植物の葉の外植片からの再生は、Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:4803 (1983)に記載されるように達成されうる。この手順において、形質転換体は、選択剤の存在下、そして形質転換された植物種においてシートの再生を促進する培地内で育てられる。この手順は典型的には2~4週間以内にシートを生じ、そして次にこれらの形質転換体シートは、選択剤及び細菌の増殖を予防する抗生物質を含む適切な根誘導培地に移される。苗を形成するために選択剤の存在下で根付いた形質転換体シートは、次に根の産生のために土に移される。当業者の一人であれば通常明白であるようにこれらの手順は、利用される個々の植物種に依存して修正される。

【0053】

子孫の個体群は、交雑受精及び無性生殖を含めた本技術分野において周知の方法により第1世代及び第2世代形質転換体から製造されうる。本発明において例示す組換え植物は、望ましいタンパク質の製造及び遺伝子の生物学的機能の分析のための試験系として有用である。

【0054】

実施例

BSG1037ウイルス又はBSG1057ウイルスを接種したタバコは、いずれかのウイルスに感染している細胞内に前記リポーター遺伝子(GFP)を発現する。(ウイルスの存在を示す)前記リポーター遺伝子活性は、長波長UV光により植物を照らすことで容易に観察される。前記導入したgfp遺伝子の発現を失ったウイルスは、もはや前記GFPタンパク質を蓄積することができないのでUV照明下でGFP蛍光を発することはない。

【0055】

前記新規ベクター内の外来遺伝子の発現の安定性を評価するために、前記gfp遺伝子を(BSG1037を作り出す)前記標準ベクター及び(BSG1057を作り出す)改良されたベクター内に導入した。これらの構築物のRNA転写物を產生し、そしてニコチアナ・ベンサミアナへの接種に用いた。接種後約7日目に、広範囲の全身的なGFP発現を観察した。GFP発現組織を採取して、リン酸緩衝液中ですりつぶして、低速遠心分離により前記細胞片を除去して、そして得た「グリーン・ジュース」上清溶液を新規の一群のN.ベンサミアナへの接種に用いた。組織全体を約7日目に再度採取し、そして得たグリーン・ジュースを一連のウイルスの継代培養に用いた。前記手順を一連のウイルスの継代培養に合計7回用いた。N.ベンサミアナにBSG1037及びBSG1057の前記第1世代継代グリーンジュースと前記第7世代継代40

10

20

30

40

50

グリーンジュースを平行して接種するところの比較を次に開始した。前記第1世代継代ウイルスは、接種後約4日目にGFPの優れた全身性発現の開始をもたらした。前記BSG1037の第7世代継代ウイルスは、わずかな全身性GFP発現と挿入した配列のほとんど又は全てを失ったベクターの特徴を示す強いウイルストMVモザイク症状をもたらした。それに反して、前記BSG1057の第7世代継代ウイルスは優れた全身性GFP発現及びその導入された遺伝子を保持しているベクターの特徴を示すわずかに見えるウイルス性症状をもたらし続けた。

【0056】

接種の20日後、前記植物を地上2インチ(5.08cm)で切断し、そして再生長させた。植物を切断後3週間まで前記新しい組織全体の中のGFPタンパク質の蓄積について観察した。BSG1037ウイルスを含む植物は、(第1世代及び第7世代継代の両方とも)再生長組織中に少量のGFPしか示さなかつたが、一方で広範囲なウイルス症状を示した。この結果は、前記ウイルス集団が、前記遺伝子挿入物を組換えにより失ったウイルスにより特徴づけられたことを示唆している。BSG1057を含む植物は、(第1世代及び第7世代継代の両方とも)再生長組織中への良好な全身性侵襲を示した。これは、BSG1037に比べてBSG1057における外来遺伝子挿入、つまりgfp遺伝子の優れた遺伝学的安定性を示唆している。

10

【0057】

この外来遺伝子の遺伝学的安定性は、2つの補足的な遺伝子挿入物：ニワトリからのインターフェロン及びヒト・アルファ・ガラクトシダーゼAの使用においても見られた。BSG1037ウイルス調製物中の両方の遺伝子の一連の継代実験は、植物内でのむらのある産物の生産を示し、一方でBSG1057における類似の実験は、植物内でのより均一な産物の蓄積を示した。上記実験は、前記BSG1057がかなりの程度まで多数の継代にわたり外来遺伝子挿入物を保持することを示唆する。

20

【0058】

本発明並びの本願発明の作製、使用のやり方と工程を、関連する当業者の前キ本願発明の対象物の作製及び使用を可能にするためにとても完全、明確、簡潔、かつ、正確に記載されている。本発明の先に記載の好ましい態様及び請求に宣言する本発明の範囲から逸脱することなくそこになされるであろう修正は理解される。発明として企図される主題を特に述べ、そして明確に請求するために上記クレームは本明細書を結論するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1a】 図1は、BSG1057ベクター(配列番号4)に含まれる変更移動タンパク質とBSG1037ベクター(配列番号3)に含まれる野生型移動タンパク質をコードするヌクレオチド配列の比較を表す。配列の一致は、*によって示され、そしてミスマッチは、-によって示す。

30

【図1b】 図1は、BSG1057ベクター(配列番号4)に含まれる変更移動タンパク質とBSG1037ベクター(配列番号3)に含まれる野生型移動タンパク質をコードするヌクレオチド配列の比較を表す。配列の一致は、*によって示され、そしてミスマッチは、-によって示す。

【図2】 図2は、BSG1057ベクター(配列番号6)に含まれる変更移動タンパク質とBSG1037ベクター(配列番号5)に含まれる野生型移動タンパク質をコードするアミノ酸配列の比較を表す。配列の一致は、*によって示され、そしてミスマッチは、-によって示す。

40

【図3】 図3は、BSG1037ベクターの制限部位の概念図である。

【図4】 図4は、BSG1057ベクターの制限部位の概念図である。

【図5a】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図5b】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図5c】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図5d】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図5e】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図6a】 図6は、BSG1057(配列番号2)の完全配列である。

【図6b】 図6は、BSG1057(配列番号2)の完全配列である。

50

【図6 c】 図6は、BSG1057（配列番号2）の完全配列である。

【図6 d】 図6は、BSG1057（配列番号2）の完全配列である。

【図6 e】 図6は、BSG1057（配列番号2）の完全配列である。

【図7】 図7は、BSG1057中の変異の位置の概念地図である。

【図8】 図8は、接種後20日目のN.ベンサミアナを示す。植物が5つずつ4列ある。一番左の列には、第1世代のBSG1037を接種した植物を示す。2列目は第7世代のBSG1037、3列目は第1世代のBSG1057、4列目は第7世代のBSG1057である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> LARGE SCALE BIOLOGY CORPORATION	10
<120> VIRAL EXPRESSION VECTORS	
<130> 008010165USPC01	
<150> 60/132,697	
<151> 1999-05-04	
<160> 6	
<170> FastSEQ for Windows Version 3.0	
<210> 1	20
<211> 7685	
<212> DNA	
<213> Nicotiana tabacum	
<400> 1	
gtattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacagac aacattacaa ttactattta	60
caattacaat ggcatacaca cagacagcta ccacatcagc tttgtggac actgtccgag	120
gaaacaactc cttggtaat gatctagaa agcgtcgct ttacgacaca gcggttgaag	180
agtttaacgc tcgtgaccgc agggccaaagg tgaacttttc aaaagtaata agcgaggagc	240
agacgcttat tgctaccgg gcgtatccag aatccaaat tacatttat aacacgcaa	300
atgcccgtca ttgcgttgcg ggtggattgc gatctttaga actggaatat ctgtatgtgc	360
aaattcccta cggatcatgt actttagaca taggcgggaa ttttgcattcg catctgttca	420
aggcgcgac atatgtacac tgctgcattgc ccaacccggc cgttcgagac atcatgcggc	480
acgaaggcca gaaagacactt atgactatccatg gtagagaga gggggggaaaa	540
cagtccccaaag ctgcataaaag gaagcatttg acagatacgc agaaatccctt gaagacgctg	600
tctgtcacaat tactttccatg acatgcgaac atcagccatg ctagaatca ggcagagtgt	660
atgcatttcg gctacacagc atatatgaca taccagccga tgatccggc gccgcactct	720
tgaggaaaaaa tgcataatcg tgctatccgg ctttccactt ctccgagaa ctgttttttg	780
aagattcatg cgtcaatttg gacgaaatca acgcgtgttt ttcgcgcgtt ggagacaagt	840
tgacccccc ttttgcattca gagatcttgc ttaattactg tcatatgtt tctaataattc	900
ttaagtatgt gtgcacaaact tacttccgg cctctaaatag agaggtttac atgaaggagt	960
ttttgttcac cagatgttac acctggttt gtaatgtttc tagatagat actttttttt	1020
tgtacaaaaagg tgcataatcg aatgttgcg atatgttgcg gttttataact gcaatggaa	1080
acgcattggca ttacaaaaag actcttgcg tgcataatcg cggatgttccatc ctccttgagg	1140
attcatatc atgtcaatttc tggatgttccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1200
tcgcatttc tggatgttccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1260
tgcatttc tggatgttccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1320
atgttttgc cttcgatccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1380
ggatgttccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1440
atactaagct tgcataatcg aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1500
aaacggatgttccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1560
ccagatgttccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1620
tcagggtqcc tgcataatcg aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1680
ctgtggacat gtcataatcg aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1740
atgcactttc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1800
ccagatgttccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1860
tcatgatccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1920
cgtatgttccatc aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	1980
aatgttgcg tgcataatcg tgcattttt	2040

ttgctggaga	tcatccggaa	tcgttcttatt	ctaagaacga	ggagatagag	tcttttagagc	2100
agtttcatat	ggcgacggca	gattcgtaa	ttcgttaagca	gatgagctcg	attgtgtaca	2160
cgggtccgat	taaagttcag	caaataaaaa	actttatcg	tagcctggta	gcatcaactat	2220
ctgtgtcggt	gtcgaatctc	gtcaagatcc	tcaaaagatac	agctgttatt	gaccttgaaa	2280
cccgtaaaa	gtttggagtc	ttggatgttg	catctaggaa	gtggtaatc	aaacccaacgg	2340
ccaagagtca	tgcatggggt	gttggtaaa	cccacgcgag	gaagtatcat	gtggcgcttt	2400
tggaaatatga	tgagcaggtt	gtggtgacat	gcgtatgtt	gagaagagta	gctgttagct	2460
ctgagtcgt	tgtttatccc	gacatggcga	aactcagaac	tctgcgcaga	ctgcttcgaa	2520
acggagaacc	gcatgtcagt	agcgcaaaagg	ttgttcttgc	ggacggagg	ccgggtctgt	2580
gaaaaccca	agaaaattttc	tccagggtta	atttgtga	agatctaatt	ttgttacctg	2640
ggaaggaaacg	cgcggaaatg	atcagaagac	gtgcgaattc	ctcaggatt	atitgtggcca	2700
cgaaggacaa	cggtttttcc	tcatgtgaa	ttttggaaa	agcacacgct		2760
gtcagttcaa	gaggttattc	attgtgttgc	ggtgtatgtt	gcataactgg	tgtgttaatt	2820
ttcttgcggc	gatgtcattt	tgcgaaatttgc	catatgttt	cgagagacaca	cagcagattc	2880
catacatcaa	tagagttca	ggattcccg	accccgccca	ttttggccaa	tttggaaatgg	2940
acgagggttgc	gacacgcaga	actactctcc	gttgcgcagc	cgatgtcaca	cattatctga	3000
acaggagata	tgagggttgc	gtcatgagca	cttcttcgg	taaaaagtct	gtttcgagg	3060
agatggtcgg	cggagccgccc	gtgatcaattt	cgatctcaaa	acccttgc	ggcaagatct	3120
tgacttttac	ccaaatcggt	aaagaagactc	tgctttcaag	agggttattca	gtgttccaca	3180
ctgtgcgt	agtgcgaaggc	gagacatact	ctgatgtttc	acttagttag	ttaaccctta	3240
caccggcttc	catcattgca	ggagacagcc	cacatgtttt	ggtgcattt	tcaaggcaca	3300
cctgttcgt	caagtactac	actgttgc	ttgatcctt	agtttagtac	attagagatc	3360
tagagaaact	tagctcgac	ttgttagata	tgatataaggt	cgatgcagg	acacaatagc	3420
aattacagat	tgactcggt	ttcaaaagg	ccaaatcttt	ttttgcagg	ccaaagactg	3480
gtgatatttc	tgatatgcag	ttttactatg	ataagtgtct	cccaggcaac	agcaccatga	3540
tgaataattt	tgatgttgc	accatgagg	tgactgtac	ttcatgttgc	gtcaaagatt	3600
gcatatttgg	tatgtcttgc	tctgttgc	cgccatagg	tcaatcaaa	ccactaatac	3660
ctatggta	aacggccgca	gaaatggcc	gccagactgg	actattgg	aatttagtgg	3720
cgatgattaa	aaagaaactt	aacgcacccg	agttgttgc	catcattgt	attgaaaata	3780
ctgcatctt	gggtttagat	aaagtttttgc	atagtttttgc	gtttaagaa	aaaagaaaac	3840
caaataaaaa	ttttttttgc	ttcgttagag	agttctctca	tagatgg	gaaaagcagg	3900
aacaggttaac	aataggccag	ctcgacattt	ttgattttgc	ggatggcca	gcagttgatc	3960
agtacagaca	catgattttt	gcacaaacca	aaacaaagg	ggacacttc	atccaaacgg	4020
agtacccggc	tttgcacacg	attgtgttcc	attcaaaaa	gatcaatgc	atattcgcc	4080
cgttgcgtt	tgagcttact	aggcaatttac	ttggacagt	tgattcgagc	agattttgt	4140
tttcacaaag	aaagacacca	gcccacatttgc	aggatttgc	cgagatctc	gacagtcatg	4200
tgccgatgg	tgttttgc	ctggatata	caaataacga	caaatctcg	aatgaattcc	4260
actgtgcgt	agaatacacg	atctgcgaa	ttttgggtt	cgaagacttc	tttggagaag	4320
tttggaaaca	agggcata	aaagacaccc	tcaaggat	taccgcagg	ataaaaactt	4380
gcatctggta	tcaaaaggaa	agcggggac	tcaacgcgtt	cattggaaac	actgtgtatc	4440
ttgctgcgt	tttggcctcg	atgctccg	ttggagaaat	aatcaaaagg	gcctttgcg	4500
gtgacgtat	tctgttgc	tttccaaagg	ttttgttgc	tccggatgt	caacactccg	4560
cgaatctt	gtggattttt	gaagcaaaac	tgttaaaa	acagtatgg	tactttgcg	4620
gaagatgt	aatacatcac	gacagaggat	gcattgttgc	ttacgttccc	ctaaagg	4680
tctcgaaact	ttgttgc	ccatcaagg	attggaaaca	cttggagg	ttcagaaggt	4740
ctcttgcgt	tgttgcgtt	tcgttgc	attgtgcgt	ttacacacag	ttggacacg	4800
ctgtatgg	gggttcata	accgccttc	cagttgc	tgtttataaa	agtctgttgc	4860
agtttgc	tgatataagg	ttttttttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	4920
ggaaaagtga	atatacatgc	ttttatgc	ctgaaaaaaa	ttggagaat	cttaccgtcg	4980
atgtttaccc	ctgtaaagg	ttttatgttgc	tccaaagg	ataaaataat	ggttcatgag	5040
aatgagtcat	ttgttgcgtt	ttttttttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	5100
gtctgttgc	ccgggttgc	ctgtacgggc	ttttttttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	5160
ggtgtgacg	tgtgttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	5220
tcttactaca	cagcagtc	aaagaaaaga	tttgcgttca	ttttttttgc	ttttttttgc	5280
ataaccaccc	aggacgcgt	aaaaaacgtc	ttggcaagttt	ttttttttgc	ttttttttgc	5340
aagatgtcag	cggttttgc	ttcgcttgc	ttggatgttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	5400
agaaataata	taaaatttgc	tttgagagag	ttttttttgc	ttttttttgc	ttttttttgc	5460

10

20

30

atggaaactta cagaagaagt cgttgatgag	ttcatggaaag atgtccctat	gtcgatcagg	5520
cttgc当地	ttcgatctcg aaccggaaaa	aagagtatg tccgcaagg	5580
agtagtgate	ggtc当地	gaacaagaac tatagaaatg	5640
agttttaaaa	agaataat	aatcgatgat gattcggagg	5700
tcgtttaaa	tagatcttac	agtatcacta ctccatctca	5760
ttaaatgg	agcaaaaggag	aagaactttt cactggagg	5820
agatggat	gttaatggc	acaattttgc tgc当地	5880
atacggaaag	cttaccctt	aattttatgg cactatgg	5940
aacacttgc	actacttttct	ctttagtggt tcaatgc	6000
gaaacggat	gacttttca	agagtgc当地	6060
atcttcaaa	gatgacggg	actacaagac gctg	6120
ccttggtaat	cgtatcgat	taaaaaggat tgc当地	6180
acacaaactc	gagtaact	ataactcaca caatgtatac	6240
gaatggatc	aaagctaact	tcaaaaattcg ccacaacatt	6300
agcagacat	tatcaacaaa	atactccat tggcgatgg	6360
ccattacat	tgocacaat	ctggcccttgc gaaagatccc	6420
ggggcttct	gagttgtt	ctgctgtgg gattacat	6480
ataatgacac	tcgaggggta	gtcaagatgc ataataaaata	6540
cacgtgg	gtacgataac	gcatatgttt tttccctcca	6600
cttggatcg	gggggtcaaa	tgtatatgg tcatatacat	6660
gaggggttcg	ggtc当地	ggctgtgaaa ctcgaaaagg	6720
agttgttagt	aatagtgtt	ataataaaga aataaaataat	6780
agttgaggaa	attgaggata	atgtaaatgt	6840
ttaatcaata	tgccctataat	aatcaactct	6900
tatcgacat	ctgtcgatgt	gatcaatctg tgc当地	6960
acgc当地	ctaggacaac	atgccaacag caat	7020
atgtatgac	tgagatttc	tgatcgat tctatgtt	7080
gatccgttga	tcacggcgtt	attaaatagc ttgcataact	7140
gataatcaac	ccgc当地	tactactgaa atcgat	7200
gcgactgtat	ctataagggc	ttcaatcaat aatttggct	7260
ggcatgttca	atcaagcaag	ctttagact gctatgg	7320
gctacttagc	tattgttgc	agattccata aataaaatgc	7380
ggtgtgat	accaaaaatca	gcatgtgg	7440
tctggatcca	acagttaaac	catgtatgg tgc当地	7500
aaaaggatcg	gaagacttac	aatttggctt ggc当地	7560
gtccacttac	aaataaacat	tgatcatatctt gatcaaca	7620
atactgtgtt	atggcgtaaa	caacggagag gttcgat	7680
gccccca		ccccctaaacc	7685

<210> 2
<211> 7686
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

```

<400> 2
gtatTTttac aacaattacc aacaacaaca aacaacagac aacattacaa ttactattta 60
caattacaat ggcatacaca cagacagcta ccacatcagc tttgctggac actgtccgag 120
gaaacaactc ctggtaaat gatctagcaa agcgtcgct ttacgacaca gcgttgaag 180
agtttaacgc tgcgtgaccgc aggcccaagg tgaactttc aaaagtaata agcgaggagc 240
agacgcttat tgctacccgg gctgtatccag aattccaaat tacattttat aacacgcaaa 300
atgcgcgtca ttgcgttgcg ggtggattgc gatcttttaga actggaaat ctgtatgtc 360
aaattcccta cggatcattg acttatgaca taggcgggaa ttttgcatcg catctgttca 420
agggacgacg atatgtacac tgctgtatgc ccaacctgga cgttcgagac atcatgcggc 480
acgaaggcca gaaaagacagt attgaactat acctttctag gctagagaga gggggggaaaa 540
cagtccccaat ttccaaaag gaagcatttg acagatacgc agaaaattct gaagacgctg 600

```

tctgtcacaa	tactttccag	acatgcgaac	atcagccgat	gcagcaatca	ggcagagtg	660
atgccattgc	gctacacagc	atatatgaca	taccagccg	tgagttcg	gggcactct	720
tgaggaaaaa	tgtccatacg	tgtatgccc	ctttccactt	ctccgagaac	ctgttcttg	780
aagattcatg	cgtcaatttg	gacgaaatca	acgcgtttt	ttcgccgat	ggagacaagt	840
tgacctttc	tttgcatac	gagagtactc	ttaattactg	tcatagttat	tctaataattc	900
ttaagtatgt	gtgaaaact	tacttccgg	cctctaatacg	agaggttac	atgaaggagt	960
ttttagtcac	cagagttat	actcggttt	gtaaagtttc	tagaatagat	actttctt	1020
tgtacaaaagg	tgtggccat	aaaagtgtag	atagtggaca	gttttatact	gcaatggaaag	1080
acgcgtgc	ttacaaaag	actcttgc	tgtgcacac	cgagagaaatc	ctccttgggg	1140
attcatcatc	agtcaattac	tgttttcc	aaatgggg	tatggtcatc	gtaccattt	1200
tcgcacattt	tttggagact	agtaagagga	cgcgcacagg	agtcttagt	tccaggatt	1260
tctgttcac	agtgcatac	cacattcgaa	cataccaggc	gaaagcttt	acatacgc	1320
atgttttgc	ttcgtcgaa	tcgattcgat	cgagggtaat	cattaacgg	gtgacagcga	1380
ggtccgaatg	ggatgtggac	aaatcttgc	tacaatcc	gtccatgac	tttacctgc	1440
atactaagct	tgccgttcta	aaggatgact	tactgattag	caagtttagt	ctcggttgc	1500
aaacgggtg	ccagcatgtg	tggatgaga	tttcgcgtgc	gtttggaaac	gcatttccct	1560
ccgtgaaaga	gaggcttgc	aacaggaaac	ttatcagagt	ggcaggcgac	gcattagaga	1620
tcagggtgc	tgatctat	gtgaccc	acgcacagatt	agtgtactg	tacaaggcct	1680
ctgtggacat	gcctgogctt	gacatttag	agaagatg	agaaaaggaa	gtgatgtaca	1740
atgcacttc	agaattatcg	gtgttgc	agtgcatac	attcgatgtt	gtatttttt	1800
cccagatgtt	ccaatcttgc	gaagttgacc	caatgcgc	agcgaagg	atagtcgcgg	1860
tcatgagca	tgagagcggt	ctgactctc	catttgcac	acctaactg	gcaatgttg	1920
cgctagctt	acaggatcaa	gagaaggctt	cagaagg	attggtagt	acctaagag	1980
aagttgaaga	accgtccatg	aagggttc	tggccagagg	agagttacaa	ttagctggc	2040
ttgctggaga	tcatccggaa	tcgtcctatt	ctaagaac	ggagatagag	tcttagagc	2100
agtttcatat	ggcgcaggc	gattcgtaa	ttcgtaa	gatgagctg	attgtgtaca	2160
cgggtccat	taaagttc	caaataaaaa	actttatc	tagcctgg	gcatcaactat	2220
ctgctcggt	gtcgaatctc	gtcaagatcc	tcaaagat	agctgtt	gaccttggaa	2280
cccgtaaaa	gtttggagtc	tttgcgttgc	catctagg	gtggtaatc	aaaccaacgg	2340
ccaagagtc	tgcattgggt	gttgcgaaat	cccacgcgc	ggagatcat	gtggcgctt	2400
tggatgcata	tgagcagggt	gttgcgtat	gcatgtat	gaaagagta	gtgttagct	2460
ctgagtcgt	tgatcttcc	gacatggc	aactcaga	tctgcgc	ctgcattc	2520
acggagaacc	gcatgtcgt	agcgc	ttgttcttgc	ggacggagtt	ccgggctgt	2580
aaaaacccaa	agaaaattctt	tccagggtt	atttgtat	agatcttatt	ttagtac	2640
ggaagcaagc	cgcggaaatg	atcagaagac	gtgcgaattc	ctcagg	attgtggca	2700
cgaaggacaa	cgtaaaaacc	gttgattctt	tcatgtat	ttttggaaa	agcacacgc	2760
gtcagttca	gagggttattc	attgtat	gttgcattt	gcatact	tggtttaatt	2820
ttcttgcgc	gatgtcatttgc	tgcgaaatttgc	catatgtt	cgagacaca	cagcaggattc	2880
catacatcaa	taggttca	ggattcccg	accccgcc	ttttggccaa	ttgaaagt	2940
acgggttgc	gacacgc	actactctc	gttgc	cgatgtc	cattatctg	3000
acggagata	tgagggttgc	gtcatgc	cttctcg	taaaaatct	gttgc	3060
agatggtcgg	cggagccg	gtatcaatc	cgatcttca	accccttgc	ggcaagatcc	3120
tgcattttc	ccaaatcgat	aaagaagctc	tgcttca	agggtat	catgttgc	3180
ctgtgcata	agtgc	aggc	tgatgtt	actagtt	ttaacc	3240
caccgg	tc	catcattgc	ggagac	catgtt	ggtcgcatt	3300
cctgttgc	ct	caagactac	actgttgc	tggatc	agtttagt	3360
tagagaaact	tagctcg	tgc	tgtat	tgtat	attagagatc	3420
aattacagat	tgactcg	ttcaaa	agggtt	ccat	tgtgc	3480
gtgatatttgc	tgat	atgc	ataatgt	cccagg	caac	3540
tgaataatttgc	tgat	gttgc	tttactat	gcata	gacaccatg	3600
gcatatttgc	tat	gtat	gcataat	tttgc	gtcaaa	3660
ctatggtac	aac	ggc	ggc	ggc	acacaat	3720
cgtatgttgc	aa	ggc	actat	ggc	atattgg	3780
ctgcattttgc	gg	ggc	ggt	gg	aaattgt	3840
caaataaaaa	tg	ttc	tttgc	tttgc	aaaaaaa	3900
aacaggttaac	aat	ttc	tttgc	tttgc	aaaaagc	3960
agtacagaca	cat	ttc	tttgc	tttgc	gacacttca	4020
catgattaaa	gc	ttc	tttgc	tttgc	atccaaacgg	

tctggatcca acagttaaac catgtatgg tgtatactgt ggtatggcgt	aaaacaacgg	7500
aaaagtcgt gaagacttaa aattcagggt ggctgatacc	aaaatcagca gtggttgtc	7560
gtccacttaa aaataacgtat	tgcatatct ggatccaaca gttaaaccat gtgatgggt	7620
atactgtggt atggcgtaaa acaacggaga gggtcgaatc	ctcccctaac cgccggtagc	7680
ggccca		7686

<210> 3
 <211> 857
 <212> DNA
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 3

atggctctag ttgttaaagg aaaagtgaat atcaatgagt ttatcgacct	gacaaaaatg	60	10
gagaagatct taccgtcgat gtttaccctt gtaaagagtg ttatgtgttc	caaagttgat	120	
aaaataatgg ttcatgagaa tgagtcattg tcaggggtga	accttcttaa aggagttaa	180	
cttattgtata gttggatacgt ctgttagcc gggttgggtcg	tcacggcga gtggaaacttg	240	
cctgacaattt gcagaggagg tggagcgtg tggatgtgg	acaaaaggat ggaaagagcc	300	
gacgaggcata ctctcgatc ttactacaca gcagctgca	agaaaaaggatt tcagttcaag	360	
gtcgttccca attatgttat aaccacccag gacgcgtat	aaaacgtctg gcaagttta	420	
gttaatattttt gaaatgtgaa gatgtcagcg aaaaacgtctg	gcaagttta gttatattttt	480	
gaaatgtgaa gatgtcagcg gggttctgtc cgctttctct	ggagtttgc tcgggtgtta	540	
ttgtttatag aaataatata aaatttaggtt tgagagagaa	gattacaac gtgagagacg	600	
gagggccat ggaacttaca gaagaagtcg ttgtatgat	catggaagat gtccctatgt	660	
cgatcaggct tgcaaaagttt cgatctcgaa ccggaaaaaa	gagtgtatgc cgcaaaaggga	720	
aaaatagtag tagtgatcg tcagtgccga acaagaacta	tagaaatgtt aaggattttt	780	
gaggaatgag ttttaaaaag aataattttaa tcgatgtat	ttcgaggct actgtcgccg	840	
aatcgatttc gttttaa		857	

<210> 4

<211> 807
 <212> DNA
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 4

atggctctag ttgttaaagg aaaagtgaat atcaatgagt ttatcgacct	gacaaaaatg	60	
gagaagatct taccgtcgat gtttaccctt gtaaagagtg ttatgtgttc	caaagttgat	120	
aaaataatgg ttcatgagaa tgagtcattg tcaggggtga	accttcttaa aggagttaa	180	
cttattgtata gttggatacgt ctgttagcc gggttgggtcg	tcacggcga gtggaaacttg	240	
cctgacaattt gcagaggagg tggagcgtg tggatgtgg	acaaaaggat ggaaagagcc	300	
gacgaggcata ctctcgatc ttactacaca gcagctgca	agaaaaaggatt tcagttcaag	360	
gtcgttccca attatgttat aaccacccag gacgcgtat	aaaacgtctg gcaagttta	420	
gttaatattttt gaaatgtgaa gatgtcagcg gggttctgtc	cgctttctct ggagtttgc	480	
tcgggtgtta ttgtttatag aaataatata aaatttaggtt	tgagagagaa gattacaac	540	
gtgagagacg gagggccat ggaacttaca gaagaagtcg	ttgtatgatgtt catggaagat	600	
gtccctatgt cgatcaggct tgcaaaagttt cgatctcgaa	ccggaaaaaa gagtgtatgc	660	
cgcaaaaggga aaaatagtag tagtgatcg tcagtgccga	acaagaacta tagaaatgtt	720	
aaggattttt gaggaatgag ttttaaaaag aataattttaa	tcgatgtatgtt tcggaggct	780	
actgtcgccg aatcgatttc gttttaa		807	

<210> 5

<211> 267
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 5

Met Ala Leu Val Val Lys Gly Lys Val Asn Ile Asn Glu Phe Ile Asp
 1 5 10 15
 Leu Thr Lys Met Glu Lys Ile Leu Pro Ser Met Phe Thr Pro Val Lys
 20 25 30
 Ser Val Met Cys Ser Lys Val Lys Ile Met Val His Glu Asn Glu Ser
 35 40 45
 Leu Ser Gly Val Asn Leu Leu Lys Gly Val Lys Leu Ile Asp Ser Gly
 50 55 60
 Tyr Val Cys Leu Ala Gly Leu Val Val Thr Gly Glu Trp Asn Leu Pro
 65 70 75 80
 Asp Asn Cys Arg Gly Val Ser Val Cys Leu Val Asp Lys Arg Met
 85 90 95
 Glu Arg Ala Asp Glu Ala Thr Leu Gly Ser Tyr Tyr Ala Ala Ala
 100 105 110
 Lys Lys Arg Phe Gln Phe Lys Val Val Pro Asn Tyr Ala Ile Thr Thr
 115 120 125
 Gln Asp Ala Met Lys Asn Val Trp Gln Val Leu Val Asn Ile Arg Asn
 130 135 140
 Val Lys Met Ser Ala Gly Phe Cys Pro Leu Ser Leu Glu Phe Val Ser
 145 150 155 160
 Val Cys Ile Val Tyr Arg Asn Asn Ile Lys Leu Gly Leu Arg Glu Lys
 165 170 175
 Ile Thr Asn Val Arg Asp Gly Gly Pro Met Glu Leu Thr Glu Glu Val
 180 185 190
 Val Asp Glu Phe Met Glu Asp Val Pro Met Ser Ile Arg Leu Ala Lys
 195 200 205
 Phe Arg Ser Arg Thr Gly Lys Lys Ser Asp Val Arg Lys Gly Lys Asn
 210 215 220
 Ser Ser Ser Asp Arg Ser Val Pro Asn Lys Asn Tyr Arg Asn Val Lys
 225 230 235 240
 Asp Phe Gly Gly Met Ser Phe Lys Lys Asn Asn Leu Ile Asp Asp Asp
 245 250 255
 Ser Glu Ala Thr Val Ala Glu Ser Asp Ser Phe
 260 265

<210> 6
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 6

Met Ala Leu Val Val Lys Gly Lys Val Asn Ile Asn Glu Phe Ile Asp
 1 5 10 15
 Leu Thr Lys Met Glu Lys Ile Leu Pro Ser Met Glu Thr Pro Val Lys
 20 25 30
 Ser Val Met Cys Ser Lys Val Asp Lys Ile Met Val His Glu Asn Glu
 35 40 45
 Ser Leu Ser Gly Val Asn Leu Leu Lys Gly Val Lys Leu Ile Asp Ser
 50 55 60
 Gly Tyr Val Cys Leu Ala Gly Leu Val Val Thr Gly Glu Trp Asn Leu
 65 70 75 80
 Pro Asp Asn Cys Arg Gly Val Ser Val Cys Leu Val Asp Lys Arg
 85 90 95
 Met Glu Arg Ala Asp Glu Ala Thr Leu Gly Ser Tyr Tyr Ala Ala
 100 105 110
 Ala Lys Lys Arg Phe Gln Phe Lys Val Val Pro Asn Tyr Ala Ile Thr
 115 120 125
 Thr Gln Asp Ala Met Lys Asn Val Trp Gln Val Leu Val Asn Ile Arg
 130 135 140
 Asn Val Lys Met Ser Ala Gly Phe Cys Pro Leu Ser Leu Glu Phe Val
 145 150 155 160
 Ser Val Cys Ile Val Tyr Arg Asn Asn Ile Lys Leu Gly Leu Arg Glu
 165 170 175
 Lys Ile Thr Asn Val Arg Asp Gly Gly Pro Met Glu Leu Thr Glu Glu
 180 185 190
 Val Val Asp Glu Phe Met Glu Asp Val Pro Met Ser Ile Arg Leu Ala
 195 200 205
 Lys Phe Arg Ser Arg Thr Gly Lys Lys Ser Asp Val Arg Lys Gly Lys
 210 215 220
 Asn Ser Ser Ser Asp Arg Ser Val Pro Asn Lys Asn Tyr Arg Asn Val
 225 230 235 240
 Lys Asp Phe Gly Gly Met Ser Phe Lys Lys Asn Asn Leu Ile Asp Asp
 245 250 255
 Asp Ser Glu Ala Thr Val Ala Glu Ser Asp Ser Phe
 260 265

【図1a】

30kDa運動タンパク質コード領域(nt54903~5709)でのB S G1037(配列番号3)とB S G1057(配列番号4)の配列の比較。不一致は、_によって示され、そして配列の一致は、*によって示される。

1037	ATGGCCTATGGTTAAAGGAAAAGTGAATATCAATGAGTTATGACCT	1057	ATGGCCTATGGTTAAAGGAAAAGTGAATATCAATGAGTTATGACCT
1057	*****	1037	*****
1037	GACAAAATGGAGAGATCTTACCGTCGAGTTAACCGCTGTAAAGCTG	1057	GACAAAATGGAGAGATCTTACCGTCGAGTTAACCGCTGTAAAGCTG
1057	*****	1037	*****
1037	TTATGTTCCAAAGTTGATAAATAATGTTCTAGCATGAGATGAGTCATG	1057	TTATGTTCCAAAGTTGATAAATAATGTTCTAGCATGAGATGAGTCATG
1057	*****	1037	*****
1037	TCAGGGGTGAACTTCTCTAAAGGAGTTAACGTTATGATGTTGGATACGT	1057	TCAGGGGTGAACTTCTCTAAAGGAGTTAACGTTATGATGTTGGATACGT
1057	*****	1037	*****
1037	CTGTTTACCGGTTGGTGTGACGGGGCGAGTGGAAGCTGCTGACAAAT	1057	CTGTTTACCGGTTGGTGTGACGGGGCGAGTGGAAGCTGCTGACAAAT
1057	*****	1037	*****
1037	GCAGAGGAAGGTGTGGGGTGTGCTGGGAGCAAAGGATGGAAAGGCC	1057	GCAGAGGAAGGTGTGGGGTGTGCTGGGAGCAAAGGATGGAAAGGCC
1057	*****	1037	*****
1037	GACGAGGCCACTCTCGGAATCTACACAGCAGCTGCAAAGAAAAGATT	1057	GACGAGGCCACTCTCGGAATCTACACAGCAGCTGCAAAGAAAAGATT
1057	*****	1037	*****
1037	TCAGTTCAAGCTCGTCCAAATTATGCTATAACCACCCAGAGGGCATGA	1057	TCAGTTCAAGCTCGTCCAAATTATGCTATAACCACCCAGAGGGCATGA
1057	*****	1037	*****
1037	AAACAGCTGGCAAGTTTATGTTAAATTTAGAAATCTGAAAGATGTCAGCG	1057	AAACAGCTGGCAAGTTTATGTTAAATTTAGAAATCTGAAAGATGTCAGCG
1057	*****	1037	*****
1037	GGTTTCCTCCGCTTCTCTGGAGTTGGTGGCGTGTGATTCGTPTAG	1057	GGTTTCCTCCGCTTCTCTGGAGTTGGTGGCGTGTGATTCGTPTAG
1057	*****	1037	*****
1037	AAATAATAAAATAGTTGAGAGAGAGATTACAACTGAGAGACCG	1057	AAATAATAAAATAGTTGAGAGAGAGATTACAACTGAGAGACCG
1057	*****	1037	*****
1037	GAGGCCCATGGAACTTACGAAAGAGCTGTTGATGAGCTCATGAGAGAT	1057	GAGGCCCATGGAACTTACGAAAGAGCTGTTGATGAGCTCATGAGAGAT
1057	*****	1037	*****
1037	GTCCTATGGATCAGGTTGCAAGTTGCACTCGATCTCGACCGGAAAGAA	1057	GTCCTATGGATCAGGTTGCAAGTTGCACTCGATCTCGACCGGAAAGAA
1057	*****	1037	*****

Figure 1a

【図1b】

1057	GAGGTGATGTCGGCAAGGGAAAAATAGTAGTAGTATCGGTTCAGTCCGA
1037	GAGGTGATGTCGGCAAGGGAAAAATAGTAGTAGTATCGGTTCAGTCCGA
1057	*****
1037	ACGAAACTATAGAATTTGGAGGAGATGAGTTTAAAGAC
1057	ACGAAACTATAGAATTTGGAGGAGATGAGTTTAAAGAC
1057	*****
1037	AATAATTTAAATCGATGATGTTGGAGGCTACTGTGCGGAATCGGATTTC
1057	AATAATTTAAATCGATGATGTTGGAGGCTACTGTGCGGAATCGGATTTC
1057	*****
1037	GTTTAA
1057	GTTTAA
1057	*****

Figure 1b

【図2】

30kDa運動タンパク質(aa1~268)でのB S G1037(配列番号5)とB S G1057(配列番号6)の配列の比較。不一致は、_によって示され、そして配列の一致は、*によって示される。

1037	MAIVVKGVVINEFIDLTKMEKILPSMFTPVKSVMSKVDK1VWHENESL	1057	MAIVVKGVVINEFIDLTKMEKILPSMFTPVKSVMSKVDK1VWHENESL
1057	*****	1037	*****
1037	SGVNLLKGKVLLDSGYVCLAGLVVYGEWNLPDNCRGGVSVCLVKMRERA	1057	SGVNLLKGKVLLDSGYVCLAGLVVYGEWNLPDNCRGGVSVCLVKMRERA
1057	*****	1037	*****
1037	DEATLGSYTTAAAKGRFQFKVVPNYAIIQQDAMKNVWQVLVNRVVKMSA	1057	DEAIGLSYTTAAAKGRFQFKVVPNYAIIQQDAMKNVWQVLVNRVVKMSA
1057	*****	1037	*****
1037	GFCPLSLEFVSVCIVYRNNIKLGLREKINTVRDGGPMELTEEVVDEFMED	1057	GFCPLSLEFVSVCIVYRNNIKLGLREKINTVRDGGPMELTEEVVDEFMED
1057	*****	1037	*****
1037	VPMISIRLAKFRSRZGKSDVRKGKNSSDRSVPNKNYRNVKDFGGMSFKK	1057	VPMISIRLAKFRSRZGKSDVRKGKNSSDRSVPNKNYRNVKDFGGMSFKK
1057	*****	1037	*****
1037	NNLIDDDSEATVAESDSF	1057	NNLIDDDSEATVAESDSF
1057	*****	1037	*****

Figure 2

【図3】

DNA配列10403 b.p. GTATTTTACAA...
CGACTCAGTATA環状
126/183リーディング・フレームは、69が始まり、3417は、抑制的ストップ・コドン、そして4919で終了する。30K

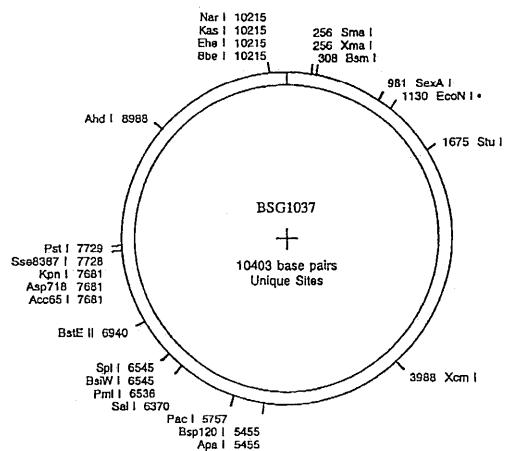


Figure 3

【 図 4 】

DNA配列10403 b.p. CTATTTTTACAA...
CGACTCACTATA環状

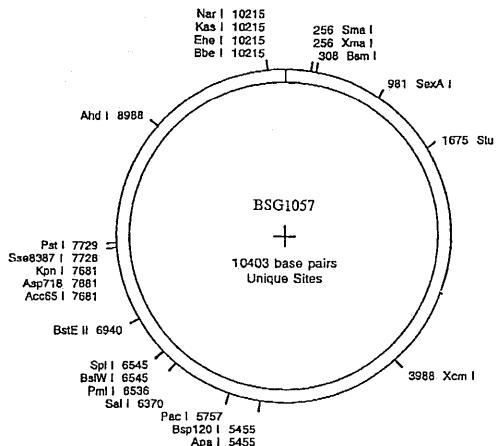


Figure 4

【図 5 a】

BSG1037の完全配列（配列番号1）

Figure 5a

【図 5 b】

Figure 5b

【図5c】

Figure 5c

【図 5 d】

Figure 5d

【図 5 e】

CTTGGAGACTGCTAGTGGACTCTGTGGACCACAACTCCGGCTACTTGTAGTATTTGTTGAGATTTCTTAAATAAAATGTC
ACTGAGAACGTTAAATTTAGGGGGTGTGATACCCAAATCAGCAGTGGTTGTTGTC
ACTTAAATAATACGAGTTGTATA
TCTGGATGCCAACTGGTAAACCATGTGATGGTTAATCTGTGGTATGCCCTAAACAA
CGGAAAGTCGCTGAAGACTTAA
AATTCAGGGTCGTTACACAAATACTCAGCAGTGGTTGTCGTCACCTAAAAAAAC
GATGTCATATCTGGATCCAAACA
GTTAAACCATGTGATGGTTAATCTGTGGTATGCCGTAACACAGGAGGGTTCGA
ATCTCCCCCTAACCGCGGtagccg
gccca

Figure 5

【図 6 a】

BSG1057の完全配列（配列番号2）：

GTATTTACACAATACCAACAAACACAAACACAGACAACTTACAATT
ACTATTTACATACTTACAATGGCATACACA
CAGACAGCTTACCATCAGCTTGTGGACACTGTCCGAGGAACAACTCT
TGGTCATAGTCTAGAACGGCTGCT
TTACAGCACAGCGGTGAGAGTTCATACGCTCGACGCCAGGCCAAGGTG
AACTTTCAGAACAGTAACTAACGGGAG
AGACCTCTATTGGCTACCCGGGTATTCAGAATTCCAATTACATTATAAC
GAAACAAATGGCTGATTGGCTGCA
GGTGGATTTGGCTATTCTTAACTGGATAGCTGGAAATCTGTATGATGCAAACTCCCTACGG
ATTCAGTACTGCTTACGATAGGGGGAA
TTTGTGACTGCGATCTGTCAGGGGAGCAGACATGCTGGCG
ACCTGGACGTCAGAGACATCTGGCG
AGGAAGGCGGAAGAACAGTATGTTAGACTATACCTTTCTAGGCTAGAGAGGG
GGGGAAAACAGTCCCACATTCTTAAAG
GAAGGATTGAGCATGGCAGAACAAATTCTGAAAGACGCTGTCGTCACATA
CTTTCAGCAGATGCCGAACATCAGCGGAT
GCGAACATTCAGGGCAGAGTGTGATGCCGTCACACAGCATATAGACATA
CCAGCGGATGAGTTGGGGGGGCACTCT
TGAGGAAAATGCTTACATCGCTGATGCCGTTTCCACTTCTCCGAGAACCTG
CTTCTGAGAATCTGCGTCAATTG
GAGCAAACTACAGCGGTTTCTGGCGATGGAGAACAGTGTGACCTTTCTT
TCGATCAAGAGAGTACTTAAATTACTG
TCATAGTATTTCTAATTTCTTAACTGTTGTCGAAACATTACTTCCGGCCCTC
TAATAGAGGGTTTACATGAAGGGT
TTTGTGACCAAGGGTAACTATCTGTTTGTAGGTTCAGAATAGACTCT
TCTTCTGAGAACGGTGGCCCAT
AAAAGTCTAGATAGTGAGCAGTTTACTGCAATGGAAGACGCTGGCAT
AAAAGAACATCTGCAATGGAACAG
CGAGAGAACTCTCTTGGGATTCATCATCAGTCATTACTGTTTCCCAAAA
TGAGGAGATGTGATCATGCTT
TCGACATTCTTGGAGACTAAGAGGACGCCAGGAAGGAGTCTTGTGTC
CAAGGATTCTTCTTCACTGGCTTAA
CACATTCTGACATCACGGGAAAGCTTCACTACGCAAATGTTTGTCCCT
CTGTCGAACTGATGTCGATGGGTAA
CTTAAACGGTGTACGGAGTGGCAATGGGATTTGGCAAAATCTTGTGTA
ACTTACATCTGCTGCTTAAAGGATGACTTACTGATTAGCAAGTTGATGTC
GGTCTGAAAGGGTGTGGCAGCATGTC
TGGGTAGAGATTCTGCTGGCTTGGGAAACGCTTCCCTCCGTCAGAAAGAGA
GGCTCTTACAGGGAAACTTATCAGAGT
GGGAGGGCGGCACTTAAAGAGATCAGGGTGTGCTGATCTATATGTCACCTTCCAC
GAGACATGTTAGTACTGAGTACAGGGCT
CTGTCGACATCTGCTGCTTGGGAGATGGGAAAGAAGATGGAAGAAACGGAGAAT
GATGTCATACGTCATTCTGCAATTACTG

Figure 6a

【図 6 b】

GTTGATGGGGAGCTGACAAATTGATGTTGATGTTTTCCAGATGTCGCA
AGGAAGGTATAGTCGGCTGATGACGATGAGAGCGGCTGACTCTCAC
TTGACGACTTACAGGATGAGGAGCTGAGAAGGCTTCAGAAGGGTCACTGGTAC
CTCGATGTTACAGGATCAAGAGAAGGCTTCAGAAGGGTCACTGGTAC
AAGGGTTCAGTGGCCAGAGGAGGATACCAATTAGCTGGTCTGAGATC
ATCCGGAATGCTCTTACATTAAGCGA
GGAGATAGCTTATGAGCTTACATGGCCAGCGCAGATTGTTAATTC
GTAAGCAGATGTTCTGATGTTACAG
GGGGCTGATTAAGCTGACAAATGAAAATTTATCGATAGCTGGTAGC
ATCACTATCTGGCTGTCGATTCAT
GTCAGAGTCTCAAGATACAGCTGTTAGCCCTGAAACCGCTAAAGT
TTGGAGCTTGTGAGTTCATGAGAA
GTGGTAAATCAACCAACGGCAAGAGTCATGCTGGGTGTTGAAACC
CACGGGGAGGATATCATGGCCCTT
TGGAAATGATGAGCAGGGTGTGTCAGTCGATGATTGGAGAAGAGTAGC
TGTAGCTGCTGATGTTATTC
GACATGCTGAACTCAGAACCTGCGGCAAGCTGCTGAAACCGGAAACCGC
ATGTCAGTGGCAAAAGGTTGTTCTGT
GGAGGAGTCTGGGGCTGGAAAACCAAAAGAAAATCTTCCAGGGTTAAT
TTGATGAGATCTAATTATGACTCTG
GGAAAGCAGCGCCGGGAAATGTCAAGAGACGCTGCAATTCCCTCAGGGATTAT
TGTGGCCAGGAAGGACACCTTAAAC
GTTGATCTTCTCATGTAATTGTTGGAAAAGCACACGCTGTCAGTTCAGAG
GTTGATCTTCTCATGTAAGGGTTGATGT
GCATACCTGGTTGTTAATTCTGTGGCGATGTCATTGTCAGGAAATTGCT
ATGTTACAGGACACAGCACAGCAGATC
CATACATCAATAGATGTTCCAGGATTCCTGGTACCCCCCCCATTTCAGGAAATTG
TGAGTGTGACGGAGTGGAGACCGAGA
ACTACTCTGGTGTGACGGGGATCTTCCTGGT
TTAAAGATCTGTTCTGGCAGGAGATGTCGGGGAGCCGGCTGATCAATCCG
ATCTCAAAACCCCTGATGCGAACAGTC
TGCATTTACCAACCTGGATAAAAGGAGCTCTGCTTCAAGAGGGTATTGAGAT
GTTACACTGCTGATGAGTCAGGAC
GAGACATCTGTTGTTGACTGAGGATGTT
ACTGAGGAGACAGCCACATGTTT
GGTCGGCTGTCAGGGACACCTGTCGCTCAAGTACTACACTGTTGTTATGG
ATCTCTTGTGATGATCATGAGATC
TAGAGAAAATCTGCTGACTGTTGAGATGTTGATAAGGTCGATGAGGAAC
ACAACTGCAAACTGAGTTCAGCTGGT
TTCAAGAGGTCACATTTGTTGAGCOCCTAAAGACTGGTGTGATATTCTGA
TATGCGATTTCATGATGAGTGTCT
CCAGCGAACAGCATGTTGAAATTTGATGTCGTTGATACCATGAGGTTG
ACTGACATTCTGATGATCTGAAAGATT

Figure 6b

【図 6 c】

Figure 6a

【図 6 d】

ACGTGAGAGGAGGGGGCCCTGAACTTACAGAAGAAGTCGTGATGAGIT
CATGGAAGATGTCCTCATGTCATCAGG
CTTGGAAAGTTCTGATCTGCAACCGGAAAAAGAGTGTGTCGCAAGGGAA
AAAAATAGTATGAGTGTGCGTCAGTCG
GAAACAGAACITATAAGATAAGGATTTGGAGGAATGAGTTAAAGAG
ATAATAGTATGAGTGTGCGTCAG
CTACTGTCGCCAGTCAGGGATCTGTTAAATGATCTACAGTATCACTACTC
CATCTGAGTCGTTGTCATGTC
ataaATGGTACAGAAAGGAGAAGAATTTCACTGGAGTGTGCCAATTCTGTT
GAAATTCTTCTGAGTGTGATTAATGGC
ACAAATTTCTGTCAGTGGAGGGGGTGAAGGTGTGCTACATACGGAAAGCT
TACACTTATTTTCTGCAACTTGTCACTACTTCTTATGGTGTCA
AAACTCTGTCATGCCAGTCACATTGCTACAT
ATGTCCTGTCAGTGGAGGGGGTGAAGGTGTGCTACATACGGAAAGCT
AAAGGGCATGACTTTTCAAGGTGGCCATGCCGAAAGGTTATGTACAGGAA
CCCACTATCTTCAAGATGACGGGA
ACTACAAAGGGCTGTCAGTGGAGGGGGTGAAGGTGTGACCCCTGTTAACATCG
TATGCGATTAAGGATGTTTTAA
GAAGATGGAAACCTTCTGGCAACAACTCGAGTACAACATAACTCACAC
ATGATGATCATACGGCAGAACAAAAAA
GAATGGAATCAAGCTACTTCAAAATGGCCACAAACATGAAAGATGGATCC
GTTCAACTGAGCATTACAAAAAA
ATACATCTGGCAATGGCTCTTCTGCTCTTACAGAACACCATCTGTCG
ACACATCTGGCTTCAGAATGTC
AAACAGAACCTGCAACTGGCTCTTCTGAGTTGAACTGCTGCTGGGAT
TACATCTGGCTTCAGGATCTTCAAA
ATAATGACATGTCAGGTTGATCTGCAACTGGCTCTTCTGAGTTGAACTGCTGCTGGG
CTGCAACTGAGTGTGCTTCAGGATCTTCAAA
GATCATGTTGTTCTGCACTTAAATCGAAGGGTTGTCCTGGATCGCG
GTCAAATGTTGATGTCATATAC
CGCCAGCAGCTTAAACCGAGGGGTTGGGTCAGGTCGCTGAAACT
GGAAAGGGTCTGGGAAACAAAAGAG
AGTGGTAGTAAATAGTGTAAATAAGAAAATAAAATAGTGGTAAGAAA
GGTTGGTAGTAAATGGGAAATGGAGATA
ATGTAAGTGTAGCAGTCTATGCGCTCATCGAGTACGTTAAATCAATATGC
CTTAACTAACTAACCTGGCAGC
TTGTTACTTAAGTTCGGCTTATGCACTCTGTCAGCTGTCAGCTGATCAATCTGTT
ACAAATGCTGGTAAACAGTCTAA
ACGGCAACAACTGGACAAACAGTCACAGCAATTGGGGATGCGTGGAAAC
CTGGCTCTGATGAGTCAGTGGATTTCC
TCGATCAGGTTTCTATGTTGATATAATTCAGCAGCTGTGATCGTTGATCA
CGGGCTTATAAAATGCTTCGACTA
GAAATGAAATAATGAGGGTGTAAATCAACCCGACCGAATACTGAAAT
CTTGAACCCGACTAGGGGTTGACG
GGGACTTGGAGTATAAGGGCTTCAATCAAAATTGGCTAATGAACIGGTCG
TGGAACTGCGatGTCATCAAGCAG

Figure 6d

【図 6 e】

Figure 6.

7

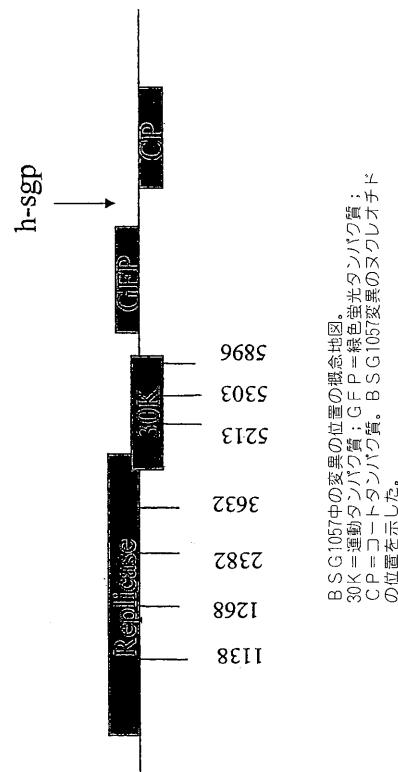


Figure 7

【図8】



Figure 8

フロントページの続き

(74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141807
弁理士 川幡 兼介

(72)発明者 フィットモーライス ウェイン ピー。
アメリカ合衆国, カリフォルニア 95688, ベイカビル, ラス エンシナス コート 121
8

(72)発明者 ポグー, グレゴリー ピー。
アメリカ合衆国, カリフォルニア 95688, ベイカビル, トリルリック コート 419

(72)発明者 リンドボー, ジョン エー。
アメリカ合衆国, カリフォルニア 95688, ベイカビル, サンダンス ドライブ 143

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 Gene, 1996年, Vol.173, pp.69-73
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986年, Vol.83, pp.5043-5047
EMBO J., 1987年, Vol.6, No.2, pp.307-311
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986年, Vol.83, pp.1832-1836
ファルマシア, 1995年, Vol.31, No.1, pp.22-26

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
A01H 5/00
C12N 5/10
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
CiNii