

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4187413号
(P4187413)

(45) 発行日 平成20年11月26日(2008.11.26)

(24) 登録日 平成20年9月19日(2008.9.19)

(51) Int.Cl.

F 1

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

請求項の数 33 (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2000-537990 (P2000-537990)
(86) (22) 出願日	平成11年3月19日 (1999.3.19)
(65) 公表番号	特表2002-507416 (P2002-507416A)
(43) 公表日	平成14年3月12日 (2002.3.12)
(86) 國際出願番号	PCT/AU1999/000195
(87) 國際公開番号	W01999/049029
(87) 國際公開日	平成11年9月30日 (1999.9.30)
審査請求日	平成15年10月14日 (2003.10.14)
(31) 優先権主張番号	PP 2492
(32) 優先日	平成10年3月20日 (1998.3.20)
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)
(31) 優先権主張番号	PP 2499
(32) 優先日	平成10年3月20日 (1998.3.20)
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)

前置審査

(73) 特許権者	590003283 コモンウェルス サイエンティフィック アンドインダストリアル リサーチ オー ガナイゼーション オーストラリア オーストラリアン キャ ¹⁰ ピタル テリトリー キャンベラ ライム ストーン アベニュー (番地なし)
(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 賢男
(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】遺伝子発現の制御

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞培養物または組織培養物中の植物細胞における標的遺伝子の発現を抑制し、遅延させ、又はその他の方法で低減させる方法であって、(a)前記標的遺伝子のコード領域またはその一部と同一な20ヌクレオチドより長いヌクレオチド配列の多重コピーを含む、分散した核酸分子又は外来性核酸分子の一つ以上を提供する工程であり、前記コピーの少なくとも一つがセンス方向であり且つ別のコピーの少なくとも一つがアンチセンス方向であって、前記センス方向のコピーおよびアンチセンス方向のコピーが前記植物細胞中で機能可能な単一のプロモーター配列の制御下に機能可能に接続されている前記工程、及び(b)前記分散した核酸分子又は外来性核酸分子を前記細胞培養物または組織培養物中の植物細胞に導入する工程を含む方法。 10

【請求項 2】

多重コピーが分断されたパリンドローム配列として存在する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

ヌクレオチド配列の多重コピーが、ヌクレオチド配列を含むスタッフター断片により互いに隔てられているものである、請求項1又は請求項2記載の方法。

【請求項 4】

スタッフター断片がイントロンとして機能する、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

ヌクレオチド配列が20ヌクレオチドより長く100ヌクレオチド長までの長さである

、請求項 1 ~ 請求項 4 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

標的遺伝子が植物細胞の内在性遺伝子である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法

。

【請求項 7】

標的遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項 1 ~ 請求項 5 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

細胞培養物または組織培養物中の植物細胞中の標的遺伝子の発現を抑制し、遅延させ又はその他の方法で低減させる方法であって、

(i) 20ヌクレオチドよりも長く、標的遺伝子のコード領域又はその一部と同一なヌクレオチド配列の多重コピーを含む分散した核酸分子又は外来性核酸分子の一つ以上を選択する工程、

(ii) 前記分散した核酸分子又は外来性核酸分子を含む合成遺伝子であって、前記コピーの少なくとも一つがセンス方向であり且つ別のコピーの少なくとも一つがアンチセンス方向で前記細胞中で機能する単一のプロモーターの制御下に機能可能に連結されている、前記合成遺伝子を製造する工程、

(iii) 前記細胞培養物または組織培養物中の植物細胞に前記合成遺伝子を導入する工程、及び

(iv) 前記細胞を、前記合成遺伝子を発現させるための時間及び条件の下に置く工程を含む方法。

【請求項 9】

前記多重コピーが分断されたパリンドローム配列として存在する、請求項 8 記載の方法

。

【請求項 10】

多重コピーがヌクレオチド配列を含むスタッファー断片により隔てられているものである請求項 8 に記載された方法。

【請求項 11】

スタッファー断片がイントロン配列として機能する請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

標的遺伝子がウイルスのレプリカーゼ、ポリメラーゼ、コートタンパク質又は脱外被タンパク質をコードする、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

標的遺伝子が細胞の内在性遺伝子である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 14】

トランسفェクトされた植物細胞において標的遺伝子の発現を遅延させ、抑制し又他の方法で低減させ得る遺伝子構築物であって、前記標的遺伝子のコード領域又はその一部と同一な、20ヌクレオチドより長いヌクレオチド配列の多重コピーを含み、且つ前記多重コピーの少なくとも 1 つのコピーがセンス方向にあり、少なくとも 1 つの他のコピーがアンチセンス方向にあって、前記多重コピーが前記植物細胞で機能しうる単一のプロモーターの制御の下で機能しうるように配置されている、前記遺伝子構築物。

【請求項 15】

ヌクレオチド配列の多重コピーがヌクレオチドの配列を含むスタッファー断片により互いに隔てられているものである、請求項 14 記載の遺伝子構築物。

【請求項 16】

スタッファー断片がイントロン配列として機能する、請求項 14 記載の遺伝子構築物。

【請求項 17】

多重コピーが分断されたパリンドローム配列として存在する、請求項 14 に記載の遺伝子構築物。

【請求項 18】

ヌクレオチド配列が 20 ヌクレオチドより長く 100 ヌクレオチド長までである、請求

10

20

30

40

50

項 14～17 のいずれか1項に記載の遺伝子構築物。

【請求項 19】

標的遺伝子が植物細胞の内在性遺伝子である請求項 14～18 のいずれか 1 項に記載の遺伝子構築物。

【請求項 20】

標的遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項 14～18 のいずれか1項に記載の遺伝子構築物。

【請求項 21】

請求項 14～請求項 20 いずれか 1 項に記載の遺伝子構築物を含む、単離された植物細胞。

10

【請求項 22】

請求項 14～20 のいずれか1項に記載の遺伝子構築物、及び担体、賦形剤又は希釈剤を含む組成物。

【請求項 23】

植物の病気の治療及び／又は予防のための合成遺伝子の調製における、植物細胞の標的遺伝子のコード領域又は一部と同一である 20 ヌクレオチドより長いヌクレオチド配列の多重コピーを含む一つ以上の分散した核酸分子又は外来性核酸分子の使用であって、前記多重コピーの少なくとも一つがセンス方向を向いており且つ前記コピーの別の少なくとも一つがアンチセンス方向を向いており、前記センス方向およびアンチセンス方向を向いているコピーが前記植物細胞中で機能し得る单一のプロモーター配列の制御の下で機能しえるよう置かれている、前記使用。

20

【請求項 24】

多重コピーが分断されたパリンドローム配列として存在する、請求項 23 記載の使用。

【請求項 25】

多重コピーがヌクレオチド配列を含むスタッファー断片により隔てられているものである、請求項 23 記載の使用。

【請求項 26】

スタッファー断片がイントロン配列として機能する、請求項 25 記載の使用。

【請求項 27】

ヌクレオチド配列が 20 より長く 100 ヌクレオチドまでのヌクレオチド長である、請求項 23～26 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 28】

植物細胞に導入すると、前記植物細胞の標的遺伝子の発現を少なくとも部分的には転写後に抑制し、遅延し又他の方法で低減させるための合成遺伝子の調製における、植物細胞の標的遺伝子のコード領域又はその一部と同一な、20 ヌクレオチドより長いヌクレオチド配列の多重コピーを含む一つ以上の分散した核酸分子又は外来性核酸分子の使用であって、前記多重コピーの少なくとも一つがセンス方向を向いており且つ前記多重コピーの少なくとも別の一つがアンチセンス方向を向いており、前記センス方向およびアンチセンス方向を向いているコピーが前記植物細胞中で機能し得る单一のプロモーター配列の制御下で機能し得るように置かれている、前記使用。

40

【請求項 29】

多重コピーが分断されたパリンドローム配列として存在する、請求項 28 記載の使用。

【請求項 30】

多重コピーがヌクレオチド配列を含むスタッファー断片により隔てられているものである、請求項 28 記載の使用。

【請求項 31】

スタッファー断片がイントロン配列として機能する、請求項 30 記載の使用。

【請求項 32】

標的遺伝子が、植物細胞の内在性遺伝子である、請求項 28～31 のいずれか1項記載の使用。

50

【請求項 3 3】

標的遺伝子がウイルス遺伝子である、請求項2 8 ~ 3 1のいずれか 1 項記載の使用。

【発明の詳細な説明】**【0 0 0 1】****発明の分野**

本発明は一般的に、トランスジェニック生物、特にトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物の細胞、組織又は器官における遺伝子発現を改変する方法並びに内因性遺伝子の発現を改変するための合成遺伝子に関する。より具体的には、本発明は、細胞、組織、器官又は全生物体における標的遺伝子の発現を転写後に改変又は調節するために、組換えDNA技術を利用し、それにより新規な表現型を創り出す。生物に導入された場合、該生物における内因性遺伝子又は標的遺伝子の発現を抑制し、遅延させ又はその他の方法で低減させることのできる新規な合成遺伝子並びに遺伝子構築物も提供される。

10

【0 0 0 2】**一般事項**

本明細書で言及される刊行物の書誌的詳細は本記載の末尾に収集される。

【0 0 0 3】

本明細書で使用されるとき、「から由来する」という用語は、記載された完全体が、必ずしも直接的にとは限らないが、記載された特定の源又は種から得られうることを示すものと解釈されるべきである。

【0 0 0 4】

本明細書を通して、文脈が他の意味を要求しない限り、「含む (comprise)」という用語、又は「含む (comprises)」若しくは「含む (comprising)」などの変形は、述べられた工程、又は要素、又は完全体、又は工程、若しくは要素若しくは完全体の集合を含むことを意味するが、他の任意の工程、又は要素、又は完全体、又は要素若しくは完全体の集合を排除することを意味するわけではないことが理解されよう。

20

【0 0 0 5】

当業者は、本明細書に記載される発明が具体的に記述されるもの以外に変形及び改変され得ることを理解する筈である。本発明は全てのこのような変形物及び改変物を包含することが理解されるべきである。本発明は、本明細書で個々に又はまとめて言及される又は示される工程、特徴、組成物及び化合物の全て、及び任意の組み合わせ、及び該工程若しくは特徴の全ての組み合わせ、又は任意の二つ以上の組合せをも包含する。

30

【0 0 0 6】

本発明は、例示目的のみを意図して本明細書に記載される具体的な態様により範囲が限定されるものではない。機能的に等価な産物、組成及び方法は、本明細書に記載されるように明らかに本発明の範囲内にある。

【0 0 0 7】

本明細書に含まれるヌクレオチド及びアミノ酸の配列情報を含む配列番号 (SEQ ID NOS.) は要約書の後に集められ、パテントイン第二版のプログラムを用いて作製された。各々のヌクレオチド又はアミノ酸の配列は、数値指標 (<210>) とそれに続く配列識別子 (例えば <210>1、<210>2 等) により配列表中で同定される。各々のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列に対する配列の長さ、型 (DNA、タンパク質 (PROT) 等) 及び起源となった生物は、それぞれ、数値指標欄の <211>、<212> 及び <213> で提供される情報により示される。本明細書で言及されるヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、数値指標欄の <400> とそれに続く配列識別子 (例えば <400>1、<400>2 等) 中で提供される情報によって定義される。

40

【0 0 0 8】

本明細書で言及されるヌクレオチド残基の名称は、IUPAC-IUB 生化学命名委員会により推奨されるものであり、A はアデニンを表し、C はシトシンを表し、G はグアニンを表し、T はチミンを表し、Y はピリミジン残基を表し、R はプリン残基を表し、M はアデニン又はシトシンを表し、K はグアニン又はチミンを表し、S はグアニン又はシトシン

50

を表し、Wはアデニン又はチミンを表し、Hはグアニン以外のヌクレオチドを表し、Bはアデニン以外のヌクレオチドを表し、Vはチミン以外のヌクレオチドを表し、Dはシトシン以外のヌクレオチドを表し、そしてNは任意のヌクレオチド残基を表す。

【0009】

本明細書で言及されるアミノ酸残基の名称は、IUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨されたもので、表1に列挙する。

【0010】

【表1】

アミノ酸	三文字記号	一文字記号	
アラニン	A l a	A	
アルギニン	A r g	R	
アスパラギン	A s n	N	
アスパラギン酸	A s p	D	
システイン	C y s	C	
グルタミン	G l n	Q	
グルタミン酸	G l u	E	20
グリシン	G l y	G	
ヒスチジン	H i s	H	
イソロイシン	I l e	I	
ロイシン	L e u	L	
リシン	L y s	K	
メチオニン	M e t	M	
フェニルアラニン	P h e	F	
プロリン	P r o	P	
セリン	S e r	S	30
トレオニン	T h r	T	
トリプトファン	T r p	W	
チロシン	T y r	Y	
バリン	V a l	V	
アスパラギン酸塩／アスパラギン	B a a	B	
グルタミン酸塩／グルタミン	Z a a	Z	
任意のアミノ酸	X a a	X	

【0011】

40

発明の背景

真核生物の代謝経路を制御することは、該生物において新規な特性を作りだすため又は該生物の特定の細胞、組織若しくは器官に新規な特性を導入するために望ましい。組換えDNA技術は真核性遺伝子発現を調節する機構の理解に重要な進展をもたらしてきたが、新規な特性を作りだすための遺伝子発現の実際の操作においてはほとんど進展はなかった。さらに、ヒトの介入により真核性遺伝子発現レベルを調節しうる手段はごく限られている。

【0012】

遺伝子発現を抑制し、遅延させ又はその他の方法で低減させるための一つのアプローチは、核遺伝子の相補鎖から正常に転写され且つポリペプチドに翻訳され得るものへと転写さ

50

れるmRNA分子を利用する。このアプローチに関与する正確な機構は確立されていないが、相補的なヌクレオチド配列間ににおける塩基対形成により二本鎖のmRNAが生じ、低い効率で翻訳され及び／又は翻訳される前に細胞内リボヌクレアーゼ酵素により分解される複合体を産生すると仮定してきた。

【0013】

または、細胞、組織又は器官における内因性遺伝子の一以上のコピー又は実質的に同様な遺伝子の一以上のコピーが該細胞に導入される場合、該遺伝子の発現は抑制されうる。この現象に関与する機構は確立されていないが、機構的に異種の工程が関与するらしい。例えば、このアプローチには、クロマチンの体細胞遺伝性の抑制状態が形成される、転写抑制が関与する、又はそうではなくて、通常転写の開始は起きるが共抑制された遺伝子のRNA産物がその後除外される、転写後サイレンシング(post-transcriptional silencing)が関与すると仮定してきた。

10

【0014】

特定遺伝子の発現の標的化におけるこれらの両アプローチの効率は非常に低く、通常、極めて多様な結果が得られる。遺伝子発現を標的化するために、遺伝子の異なる領域、例えば、5' - 非翻訳領域、3' - 非翻訳領域、コード領域又はイントロン配列を用いることにより、一貫性のない結果が得られる。従って、現在のところ、既存の技術を用いて遺伝子発現を抑制し、遅延させ又はその他の方法で低減させるための最も効率の良い手段を与える遺伝的配列の性質に関しては意見の一致は存在しない。さらに、世代間でこのような高い程度の差異が存在するため、遺伝子発現が著しく変更された生物の子孫における特定遺伝子の抑制レベルを予測することはできない。

20

【0015】

最近、ドレルとヘニコップ(1994年)は、ショウジョウバエのゲノムにおける縦列反復した遺伝子コピーのサイレンシング並びにポリコーム(Polycomb)遺伝子(即ち、Pc-G系; パル-バハドラら、1997年)による分散されたショウジョウバエのAdh遺伝子の転写抑制を証明した。しかし、特定遺伝子の発現を標的化できる配列がゲノムの分散された位置に導入され、このアプローチと遺伝子標的化技術との組み合わせを欠いている場合は、縦列反復した遺伝子コピーのこのようなサイレンシングは、動物細胞で組換え手段により遺伝子発現を操作する試みにおいてほとんど有用性がない。理論的には可能であるが、このような組み合わせは、単独で用いられる遺伝子標的化アプローチの低い効率に基づけば低効率でしか作用しないと予想され、さらに複雑なベクター系を必要とするであろう。さらに、ショウジョウバエのPc-G系のような転写抑制の利用は、任意の特定標的遺伝子の発現を調節できる調節機構についての何らかの知識を要するようであり、結果として、動物細胞において遺伝子発現を抑制し、遅延させ又は低減させるための一般的技術として実際に実行するのは困難であろう。

30

【0016】

これらの現象に関与する機構についての理解の乏しさは、遺伝子発現のレベルを調節するための技術、特に組換えDNA技術を用いて特定遺伝子の発現を遅延させ、抑制し又はその他の方法で低減させるための技術の改良がほとんどなかったことを意味する。さらに、これらのアプローチが予測不可能である結果として、現在、真核生物又は原核生物における特定遺伝子の発現レベルを調節するための商業的に実行可能な手段はない。

40

【0017】

従って、動物細胞へ新規な表現型特性を導入するために、遺伝子発現を調節する、特に動物細胞における遺伝子発現を抑制し、遅延させ又はその他の方法で低減させる改良された方法に対する必要性が存在する。特に、これらの方法は、同時に遺伝子標的化アプローチを行う必要なく、表現型の変更のための一般的手段を提供すべきである。

【0018】

本発明の概要

本発明は、一つ以上の望ましい特性を示す細胞を作成でき、しかもプロモーターに機能的に連結された核酸分子を含む形質転換細胞からそれを選択し得るという本発明者らによる

50

驚くべき発見であって、該核酸分子の転写産物がその発現を調節しようと意図する内因性又は非内因性標的遺伝子の転写産物のヌクレオチド配列と実質的に同一なヌクレオチド配列を含むものである発見に一部基づいている。この形質転換された細胞は、新規な特性、具体的にはウイルス耐性、及び内因性遺伝子の改変された発見を示すことのできる全組織、全器官又は全生物へと再生される。

【0019】

従って、本発明の一つの側面は、動物の細胞、組織又は器官における標的遺伝子の発現を調節する方法であって、標的遺伝子のmRNA産物の翻訳が改変されるのに充分な時間及び条件の下で、該mRNA産物の転写が必ずしも抑制又は低減されるとは限らないことを条件として、該標的遺伝子のヌクレオチド配列と実質的に同一なヌクレオチド配列又はその一領域又はそれに相補的な配列の多重コピーを含む一つ以上の分散した核酸分子又は外来性核酸分子を該細胞、組織又は器官に導入する工程を少なくとも含む方法を提供する。10

【0020】

特に好ましい態様において、分散した核酸分子又は外来性核酸分子は、標的遺伝子のmRNA産物のヌクレオチド配列と実質的に同一なmRNA分子の多重コピーをコードするヌクレオチド配列を含む。標的分子の該複数コピーは縦列直列反復配列であることがより好ましい。

【0021】

より具体的に好ましい態様において、分散した核酸分子又は外来性核酸分子は少なくとも転写してmRNAを產生することが可能であるような発現可能な形態で存在する。20

【0022】

該標的遺伝子は、動物細胞にとって内因性である遺伝子、又はとりわけウイルス若しくは外来性の遺伝子配列などの外来性遺伝子でありうる。好ましくは、標的遺伝子はウイルスの遺伝子配列である。

【0023】

本発明は真核性遺伝子発現の調節、特にヒト又は動物の遺伝子発現の調節、さらにより具体的には脊椎動物及び昆虫、水生動物などの無脊椎動物（例えば、魚、貝、軟体動物、カニ、ロブスター及びエビなどの甲殻類）、鳥類、並びにとりわけ哺乳類に由来する遺伝子の発現調節にとりわけ有用である。30

【0024】

適切な手法及び充分な数の形質転換細胞を用いて、多様な特性が選択可能である。このような特性には可視的な特性、病気耐性の特性、及び病原体耐性の特性が含まれるが、これらに限定されない。この調節効果は、例えば、がん遺伝子、転写因子、及び細胞の代謝に関与するポリペプチドをコードする他の遺伝子などの細胞の代謝、又は細胞の形質転換の原因となる内因性遺伝子を含む植物及び動物において発現する種々の遺伝子に適用可能である。

【0025】

例えば、マウスの色素産生の改変は、マウスにおけるチロシナーゼ遺伝子の発現を標的化することにより遺伝子工学的に行うことができる。これは黒色マウスに色素欠乏症の新規な表現型を付与する。植物細胞又は動物細胞においてウイルス複製に必要な遺伝子を標的化することにより、ウイルスのレプリカーゼ、ポリメラーゼ、コートタンパク質、又は脱外被遺伝子、又はプロテアーゼタンパク質をコードするヌクレオチド配列の多重コピーを含む遺伝子構築物をそれを発現する細胞に導入して、ウイルスに対する免疫性を前記細胞に付与することができる。40

【0026】

本発明の実施において、分散した核酸分子又は外来性の核酸分子は一般的に標的遺伝子配列に対して約85%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。しかし、相同性が高いほど標的遺伝子配列の発現をより効果的に調節するかも知れない。実質的に高い相同性、即ち約90%以上の相同性が好ましく、さらにより好ましくは約95%から完全な同一性であることが望ましい。50

【 0 0 2 7 】

完全な相同性を必要としない、導入された分散した核酸分子又は外来性核酸分子の配列は、標的遺伝子の一次転写産物か又は標的遺伝子の完全にプロセシングされたmRNAのいずれかに関して全長である必要もない。全長より短い配列でも相同性が高ければ、より長いが相同性の低い配列に匹敵する。さらに、導入された配列はイントロン又はエキソンの同じパターンを有する必要はなく、そして非コード部分の相同性は同様に効果的である。通常、20～100ヌクレオチドより大きな配列が使用されるべきであるが、約200～300ヌクレオチドより大きな配列が好ましく、標的遺伝子の大きさに応じて、500～1000ヌクレオチドより大きな配列が特に好ましい。

【 0 0 2 8 】

10

本発明の第二の側面は、合成遺伝子でトランスフェクション又は形質転換された原核生物又は真核生物の細胞、組織又は器官における標的遺伝子の発現を改変できる該合成遺伝子であって、該細胞、組織若しくは器官中で機能しうるプロモーター配列の制御下で機能しうるように配置された、標的遺伝子ヌクレオチド配列に実質的に同一なヌクレオチド配列、若しくはその誘導体、若しくはそれに相補的な配列の多重コピーを含む、分散した核酸分子又は外来性核酸分子を少なくとも含む合成遺伝子を提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明の第三の側面は、合成遺伝子でトランスフェクション又は形質転換された原核生物又は真核生物の細胞、組織又は器官において標的遺伝子の発現を改変できる該合成遺伝子であって、該合成遺伝子が少なくとも多重構造遺伝子配列を含み、該構造遺伝子配列のそれぞれが標的遺伝子のヌクレオチド配列と実質的に同一なヌクレオチド配列、若しくはその誘導体若しくはそれに相補的な配列を含み、該多重構造遺伝子配列が該細胞、組織又は器官で機能しうる単独のプロモーター配列の制御下に機能しうるように配置されるものである合成遺伝子を提供する。

20

【 0 0 3 0 】

本発明の第四の側面は、合成遺伝子でトランスフェクション又は形質転換された原核生物又は真核生物の細胞、組織又は器官における標的遺伝子の発現を改変できる合成遺伝子であって、該合成遺伝子が少なくとも多重構造遺伝子配列を含み、該構造遺伝子配列のそれぞれが該細胞、組織又は器官で機能しうるプロモーター配列の制御下で機能しうるように配置され、該構造遺伝子配列のそれぞれが標的遺伝子のヌクレオチド配列と実質的に同一なヌクレオチド配列、若しくはその誘導体、若しくはそれに相補的な配列を含むものである合成遺伝子を提供する。

30

【 0 0 3 1 】

本発明の第五の側面は、形質転換又はトランスフェクションされた細胞、組織又は器官における内因性遺伝子又は標的遺伝子の発現を改変できる遺伝子構築物であって、少なくとも本発明の合成遺伝子及び一つ以上の複製起点及び／又は選択可能なマーカー遺伝子配列を含む遺伝子構築物を提供する。

【 0 0 3 2 】

40

植物及び動物などの多細胞生物における多くの新規な特性、特に組織特異的な特性、又は器官特異的な特性、又は発生上で制御される特性を観察するためには、本明細書に記載される合成遺伝子及び遺伝子構築物を保持する形質転換された細胞を生物体へ再生させることが必要となる。当業者は、これが形質転換された植物細胞又は動物細胞、そのような細胞の集団、組織又は器官から完全な生物体を成長させることを意味することを承知しているであろう。単離された細胞及び組織から植物及び動物を再生させるための標準的方法は当業者に知られている。

【 0 0 3 3 】

こうして、本発明の第六の側面は、本明細書に記載される合成遺伝子及び遺伝子構築物を含む細胞、組織、器官又は生物を提供する。

【 0 0 3 4 】

発明の詳細な説明

50

本発明は細胞、組織又は器官における標的遺伝子の発現を調節する方法を提供する。該方法は、標的遺伝子のmRNA産物の翻訳を改変するのに充分な時間及び条件の下で、該mRNA産物の転写が必ずしも抑制又は低減されないことを条件として、該標的遺伝子のヌクレオチド配列と実質的に同一なヌクレオチド配列若しくはその一領域若しくはそれに相補的なヌクレオチド配列の多重コピーを含む一つ以上の分散した核酸分子若しくは外来性核酸分子を該細胞、組織又は器官に導入する工程を少なくとも含む。

【0035】

「多重コピー」とは、標的遺伝子の二つ以上のコピーが同方向又は異方向で同一の核酸分子上に密接な物理的関係で又は並列して存在すること、必要ならば各反復間で二次構造の形成を容易にするためにスタッファー(stuffer)断片又は遺伝子間領域により随意的に分離されていることを意味する。このスタッファー断片はヌクレオチド残基若しくはアミノ酸残基、炭水化物分子若しくはオリゴ糖分子、又は炭素原子、又はそれらのホモログ、類似体又は誘導体の任意の組み合わせを含みうるものであって、核酸分子に共有結合できるものである。10

【0036】

好みしい態様では、このスタッファー断片はヌクレオチドの配列若しくはそのホモログ、類似体又は誘導体を含む。

【0037】

より好みしくは、このスタッファー断片は少なくとも約10～50ヌクレオチドの長さ、さらにより好みしくは少なくとも約50～100ヌクレオチドの長さ、さらに一層より好みしくは少なくとも約100～500ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列を含む。20

【0038】

分散した又は外来性の核酸分子がイントロン／エキソン・スプライシング連結配列を含むと、スタッファー断片は遺伝子の5'末端に近い方の構造遺伝子の3'スプライシング部位とその隣の下流単位の5'スプライシング部位との間に位置するイントロン配列として働きうる。または、分散した外来性の核酸分子の三つ以上の近接したヌクレオチド配列単位が翻訳されることが望まれる場合、当業者には明白なように、それらの間に位置するスタッファー断片は、スタッファー断片の両末端にイントロン／エキソン・スプライシング連結配列を持たない、枠内の翻訳停止コドンを含むべきでなく、又は各単位の5'末端には翻訳開始コドンの付加を含むべきでない。30

【0039】

好みしいスタッファー断片は、検出可能なマーカータンパク質又はその生物学的に活性な類似体及び誘導体、例えば、中でもルシフェラーゼ、-ガラクトロナーゼ、-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ又は緑色蛍光タンパク質をコードするものである。スタッファー断片の追加は排除されない。

【0040】

この態様によれば、検出可能なマーカー又はその類似体又は誘導体は、特異的に検出可能な表現型、好みしくは視覚的に検出可能な表現型を細胞、組織又は器官に付与できる能力のため、細胞等において本発明の合成遺伝子の発現を示すのに役立つ。

【0041】

本明細書で使用されるとき、「調節する」という用語は、本明細書に記載の発明方法を用いない遺伝子の発現と比較して、標的遺伝子の発現が量的に低減され、及び／又は遺伝子発現のタイミングが遅延し、及び／又は標的遺伝子の発現の発生上のパターン、又は組織特異的なパターン、又は細胞特異的なパターンが改変されることを意味すると解釈されるべきである。40

【0042】

本明細書に記載される本発明の範囲を制限することはないが、本発明は、真核生物、特に单子葉植物若しくは双子葉植物などの植物、又はヒト若しくは他の動物、さらにより具体的には脊椎動物及び昆虫、水生動物などの無脊椎動物（例えば、中でも、魚、貝、軟体動物、カニ、ロブスター、及びエビなどの甲殻類）、鳥類、又は哺乳類の特定の細胞、組織50

又は器官での標的遺伝子の発現の程度における抑制、遅延又は低減を含む遺伝子発現の調節に関する。

【0043】

より好ましくは、標的遺伝子の発現は、細胞、組織又は器官に導入された分散した核酸分子又は外来性の核酸分子により完全に不活性化される。

【0044】

如何なる理論又は作用様式にも拘束されるものではないが、本発明の実施に起因する標的遺伝子発現の低減又消滅は、標的遺伝子のmRNA転写産物の翻訳の低減又は遅延に帰することができ、あるいは内因性の宿主細胞系による標的遺伝子のmRNA転写物の配列特異的分解の結果としての該mRNAの翻訳の阻止に帰することができる。 10

【0045】

最良の結果として、標的遺伝子のmRNA転写産物が通常翻訳される時若しくは段階の前か、又は標的遺伝子のmRNA転写産物が通常翻訳される時と同時のいずれかで、標的遺伝子のmRNA転写物の配列特異的な分解が生じることが特に好ましい。従って、導入された分散した核酸分子又は外来性核酸分子の発現を調節するために適切なプロモーター配列を選択することは、本発明の最適な実施を考慮する上で重要である。このため、導入された分散した核酸分子又は外来性核酸分子の発現を調節する際に強力な構成的プロモーター又は誘導可能なプロモーター系の使用がとくに好ましい。

【0046】

本発明は、発現の低減であって、転写の低下によってもたらされる標的遺伝子の発現の低減をも明らかに包含する。ただし、転写の低減がそれが起きる唯一の機構ではなくそして転写の低減が定常状態のmRNAプールの翻訳の低減を少なくとも伴うことを条件とする。 20

【0047】

該標的遺伝子は動物細胞にとって内因性の遺伝子配列であってもよく、またウイルス若しくは他の外来性病原性生物に由来し且つ細胞に入り込むことができそして感染後に細胞の装置を用いることができる遺伝子配列のような非内因性遺伝子配列であってもよい。

【0048】

標的遺伝子が動物細胞にとって非内因性の遺伝子配列である場合、標的遺伝子はウイルス若しくは他の病原体の複製又は増殖に必須の機能をコードするものであることが好ましい。このような態様において、本発明は特に動物細胞のウイルス感染の予防処置及び治療処置、あるいは該病原体に対する耐性の付与若しくは刺激に特に有用である。 30

【0049】

標的遺伝子は、植物又は動物の細胞、組織又は器官のウイルス病原体の一つ以上のヌクレオチド配列を含むことが好ましい。

【0050】

例えば、動物及びヒトの場合、ウイルス病原体はレトロウイルス、例えば免疫不全ウイルスなどのレンチウイルス、ウシのエンテロウイルス(BEV)又はシンドビス・アルファウイルスなどの一本鎖(+)RNAウイルスでありうる。又は、標的遺伝子は、とりわけ、ウシのヘルペスウイルス又は単純ヘルペスウイルスI(HSV)などの二本鎖DNAウイルスといった(ただしこれらに限定されない)動物の細胞、組織又は器官のウイルス病原体の一つ以上のヌクレオチド配列を含むことができる。 40

【0051】

植物の場合、ウイルス病原体は、ポチウイルス、カリモウイルス、バドナウイルス、ジェミニウイルス、レオウイルス、ラブドウイルス、ブニアウイルス、トスピウイルス、テヌイウイルス、トンブスウイルス、ルテオウイルス、ソベモウイルス、プロモウイルス、ククモウイルス、アイラウイルス、アルファモウイルス、タバモウイルス、トブラウイルス、ポテックスウイルス、及びクロステロウイルスが好ましく、中でもCaMV、SCSV、PVX、PVY、PLRV、及びTMVが好ましいが、これらに限定されない。

【0052】

10

20

30

40

50

特にウイルス病原体に関して、当業者は、ウイルスがコードする機能は宿主細胞によりコードされるポリペプチドによって「イントラーンス」に補完されうることを承知している。例えば、宿主細胞におけるウシのヘルペスウイルスゲノムの複製は、不活性化されたウイルスのDNAポリメラーゼ遺伝子を補完することができる宿主細胞のDNAポリメラーゼにより促進されうる。

【0053】

従って、標的遺伝子が動物細胞にとって非内因性の遺伝子配列である場合、本発明のさらなる代替の態様は、ウイルスに特異的な遺伝子配列などの宿主細胞の機能によって補完され得ないウイルスポリペプチド又は外来性ポリペプチドをコードする標的遺伝子を提供する。本発明のこの態様の典型的な標的遺伝子には、中でも、ウイルスコートタンパク質、脱外被タンパク質、及びRNA依存性DNAポリメラーゼ、及びRNA依存性RNAポリメラーゼをコードする遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。10

【0054】

本発明の特に好ましい態様において、標的遺伝子はBEVのRNA依存性RNAポリメラーゼ遺伝子又はそのホモログ、類似体若しくは誘導体、又はPVY・Niaプロテアーゼをコードする配列である。

【0055】

標的遺伝子の発現が改変される細胞は、多細胞の植物又は動物、それらの細胞及び組織の培養物に由来する任意の細胞でありうる。好ましくは、該動物細胞は昆虫、爬虫類、両生類、鳥類、ヒト又は他の哺乳類に由来する。典型的な動物細胞には、とりわけ、胚性幹細胞、培養された皮膚纖維芽細胞、神経細胞、体細胞、造血幹細胞、T細胞、及び不死化細胞系統、例えばCOS、VERO、HeLa、マウスC127、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、WI-38、ベビーハムスター腎臓(BHK)又はMDBK細胞系統が含まれる。このような細胞及び細胞系統は当業者にとって容易に入手できる。従って、標的遺伝子の発現が改変された組織又は器官はこのような動物細胞を含む任意の組織又は器官であってもよい。20

【0056】

植物細胞は单子葉植物又は双子葉植物種又はそれらから誘導された細胞系統に由来するものであることが好ましい。

【0057】

本明細書で使用されるとき、「分散した核酸分子」という用語は、核酸分子が導入される細胞、組織又は器官に起源を有する遺伝子のヌクレオチド配列と実質的に同一又は相補的なヌクレオチド配列の一つ以上の多重コピー、好ましくは縦列直列反復を含む核酸分子であって、組換え手段により動物の細胞、組織又は器官に導入され、一般に染色体外核酸として又は該遺伝子に遺伝的に連結しない組込まれた染色体核酸として存在するという意味で非内因性である核酸分子、を指すと解釈されるべきである。さらに具体的には、「分散した核酸分子」は、縦列に連結しないため、又は同じ染色体上で異なる染色体の位置を占めるため、又は異なる染色体上に局在するため、又はエピソーム、プラスミド、コスミド又はウイルス粒子として細胞に存在するため、物理的地図中で目的の標的遺伝子に連結しない染色体又は染色体外の核酸を含む。30

【0058】

「外来性核酸分子」とは、外来性の核酸分子が導入された生物と異なる生物の遺伝子配列に由来するヌクレオチド配列の一つ以上の多重コピー、好ましくは縦列直列反復を有する単離された核酸分子を意味する。この定義は、核酸分子が導入された分類学上の群と同一の最下位の分類学上の群(即ち同一集団)の異なる個体に由来する核酸分子、並びにウイルス病原体に由来する遺伝子のように核酸分子が導入された分類学上の群と異なる分類学上の群の異なる個体に由来する核酸分子を包含する。40

【0059】

従って、本発明の実施において、外来性核酸分子が作用する標的遺伝子は、形質転換又はイントログレッション(introgression)の技術を用いて、ある生物から他の生物へ導入さ50

れた核酸分子であってもよい。本発明のこの態様の典型的な標的遺伝子には、クラゲのエクオリア・ビクトリアに由来する緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子（プラッセルら、1992；国際特許公開番号WO 95/07463）、チロシナーゼ遺伝子、特にネズミのチロシナーゼ遺伝子（ウォンら、1988）、lac Z 遺伝子のポリペプチド抑制因子をコードできる大腸菌のlac I 遺伝子、本明細書で例示されるブタの -1,3- ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子（NCBI 登録番号L36535）、及び本明細書で例示されるPVY 及びBEV の構造遺伝子、又はそれらの遺伝子のホモログ、類似体、若しくは誘導体、又はそれらに相補的なヌクレオチド配列が含まれる。

【0060】

本発明はさらに、例えば、共発現した標的遺伝子のそれぞれに実質的に同一なヌクレオチド配列を含む分散した核酸分子又は外来性の核酸分子を用いて、特定の細胞で共発現する幾つかの標的遺伝子の発現を同時に標的化するために有用である。10

【0061】

「実質的に同一な」とは、本発明の導入された分散した核酸分子又は外来性核酸分子と標的遺伝子配列とが、標準的な細胞内条件下で両者間に塩基対の形成が可能となる程にヌクレオチド配列レベルで十分に同一であることを意味する。

【0062】

本発明の分散した核酸分子又は外来性核酸分子における各反復のヌクレオチド配列と標的遺伝子配列の一部のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列レベルで少なくとも約80～85%同一であることが好ましく、少なくとも約85～90%同一であることがより好ましく、少なくとも約90～95%同一であることがさらにより好ましく、ヌクレオチド配列レベルで少なくとも約95～99%又は100%同一であることがさらにより一層好ましい。20

【0063】

本発明は、本発明の分散した核酸分子又は外来性核酸分子における反復配列の正確な数によって制限されるわけではないが、本発明は細胞中で発現されるべき標的遺伝子配列の少なくとも二つのコピーを必要とすると理解されるべきである。

【0064】

標的遺伝子配列の多重コピーは縦列逆反復配列及び/又は縦列直列反復配列として分散した核酸分子又は外来性核酸分子中に存在することが好ましい。このような配置はGal t、BEV又はPVYの遺伝子領域を含み本明細書に記載される「テストプラスミド」により例示される。30

【0065】

細胞、組織又は器官に導入される分散した核酸分子又は外来性核酸分子はRNA又はDNAを含むことが好ましい。

【0066】

分散した核酸分子又は外来性核酸分子は標的遺伝子によってコードされるアミノ酸配列をコードできるヌクレオチド配列又は相補的なヌクレオチド配列を含むことが好ましい。これらの核酸分子は一つ以上のATG又はAUGの翻訳開始コドンを含むことがさらにより好ましい。40

【0067】

標的遺伝子の発現を調節する目的で分散した核酸分子又は外来性核酸分子を細胞、組織又は器官に導入するため、標準的な方法が用いられる。例えば、核酸分子は裸のDNA又はRNAとして導入されうるし、任意選択的にリポソーム内にカプセル化して、弱毒化されたウイルスとしてのウイルス粒子内に入れ、又はウイルス外被又は輸送タンパク質又は金などの不活性担体と結合させて又は組換えのウイルスベクター若しくは細菌ベクターとして又はとりわけ遺伝子構築物として導入されうる。

【0068】

投与方法としては、とりわけ注射及び経口摂取（例えば、医薬用食品物質）が挙げられる。50

【0069】

本核酸分子は、腸の微生物叢に取り込まれうる細菌内での発現に適した細菌発現系を用いるなど生きている送達系によっても送達されうる。又は、ウイルスの発現系が使用され得る。この点で、ウイルス発現の一つの形態は、感染に効果的な量の生きているベクター（例えば、ウイルス又は細菌）が動物に供給される場合、一般的に噴霧、飼料又は水による生きているベクターの投与である。ウイルス発現系の他の形態は細胞に感染できるが細胞内で複製できない非複製性ウイルスベクターである。この非複製性ウイルスベクターは、一過性の発現用に本遺伝物質をヒト又は動物の患者に導入する手段を提供する。このようなベクターを投与する様式は生きているウイルスベクターと同様である。

【0070】

本核酸分子を宿主細胞に送達するのに利用される担体、賦形剤及び／又は希釈剤はヒト又は獣医の適用に許容されるべきものである。このような担体、賦形剤及び／又は希釈剤は当業者に周知である。獣医学的使用に適切な担体及び／又は希釈剤には、任意の及び全ての溶媒、分散媒、水溶液、被覆剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等が挙げられる。従来の媒体又は薬剤は活性成分との配合が禁忌であるものを除き、組成物でのその使用が意図される。補足の活性成分もこの組成物に組込まれ得る。

【0071】

別の態様において、本発明は、細胞、組織又は器官における標的遺伝子の発現を調節する方法であって、少なくとも以下の工程、すなわち

(i) 該標的遺伝子のヌクレオチド配列と実質的に同一なヌクレオチド配列又はその一領域またはそれに相補的なヌクレオチド配列の多重コピーを含む一つ以上の分散した核酸分子又は外来性核酸分子を選択する工程、及び

(ii) mRNA産物の転写が専ら抑制又は低減されるのではないという条件付きで、標的遺伝子のmRNA産物の翻訳が改変されるのに充分な時間及び条件の下で、分散した核酸分子又は外来性核酸分子を細胞、組織又は器官に導入する工程、
を含む方法を提供する。

【0072】

標的遺伝子の発現を標的化するのに適切なヌクレオチド配列を選択するため、幾つかのアプローチが用いられる。一つの態様では、特性決定された遺伝子の特定の領域の多重コピーを、適切なプロモーターと機能しうるように連結させてクローニングし、標的遺伝子の発現を低減させる効果を検定する。または、遺伝子配列の多重コピーを含むショットガンライブラリーを作成し、標的遺伝子の発現を低減させるそれらの効果を検定する。後者のアプローチに伴う利点は、細胞の望ましくない表現型の発現における特定の標的遺伝子の重要性について何らの先行知識も有する必要がないことである。例えば、任意のウイルス遺伝子が宿主細胞の病因に果たす役割についての先行知識がなくとも、ウイルスのサブゲノム断片を含むショットガンライブラリーを使用して、動物宿主細胞にウイルスの免疫性を付与する能力を直接試験しうる。

【0073】

本明細書で用いられるとき、「ショットガンライブラリー」という用語は、多様なヌクレオチド配列の一組である。この一組の各構成要素は、細胞宿主の維持及び／又は複製に適した適切なプラスミド、コスミド、バクテリオファージ、又はウイルスベクター分子内に含まれていることが好ましい。「ショットガンライブラリー」という用語には、ヌクレオチド配列間の相違の程度が多大であるため該ヌクレオチド配列の由来する生物のゲノムの全配列が「一組」で存在する典型的なライブラリー、又は配列間の相違の程度がより少ない限定されたライブラリーが含まれる。「ショットガンライブラリー」という用語はさらに、ヌクレオチド配列がせん断により得られる、又は他のアプローチの中でも制限エンドヌクレアーゼを用いて例えばゲノムDNAの部分的消化により得られる、ウイルス又は細胞のゲノム断片を含む無作為ヌクレオチド配列を包含する。さらに、「ショットガンライブラリー」には、多様な一組の各ヌクレオチド配列を含む細胞、ウイルス粒子及びバクテリオファージ粒子が含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

本発明のこの態様の好ましいショットガンライブラリーは、植物又は動物のウイルス病原体に由来する一組の縦列反復ヌクレオチド配列を含む「典型的なライブラリー」である。

【 0 0 7 5 】

とくに好ましい本発明の態様において、ショットガンライブラリーは、多様な一組のアミノ酸配列をコードする多様な一組の縦列反復ヌクレオチド配列を含む細胞、ウイルス粒子又はバクテリオファージ粒子を含む。この多様な一組のヌクレオチド配列の構成要素は、細胞中で該縦列反復ヌクレオチド配列の発現を指示することができるプロモーター配列の制御の下で機能可能なように配置される。

【 0 0 7 6 】

10

従って、縦列反復配列における各単位のヌクレオチド配列は少なくとも約1から200の長さのヌクレオチドを含みうる。より大きな断片の使用、特にウイルス、植物又は動物のゲノムに由来する無作為にせん断された核酸の使用は、除外されない。

【 0 0 7 7 】

導入された核酸分子は発現可能な形態であることが好ましい。

【 0 0 7 8 】

「発現可能な形態」とは、本核酸分子が少なくとも転写レベルで細胞、組織、器官又は生物全体で発現しうるような配置で存在することを意味する（即ち、それは動物細胞中で発現し、少なくともmRNA産物を生じ、該産物は任意的に翻訳可能であるか又は翻訳されて組換えのペプチド、オリゴペプチド又はポリペプチドの分子を生産する）。

20

【 0 0 7 9 】

例として、目的の細胞、組織又は器官内で分散した核酸分子又は外来性核酸分子を発現させるために、合成遺伝子又は該合成遺伝子を含む遺伝子構築物が作成される。この合成遺伝子はその中で発現を調節できるプロモーター配列と機能しうるように連結された上記記載のヌクレオチド配列を含む。こうして、本核酸分子は真核性の転写が起きるのに充分な一つ以上の調節要素と機能しうるように連結される。

【 0 0 8 0 】

従って、本発明のさらに別の態様は動物の細胞、組織又は器官における標的遺伝子の発現を調節する方法であって、少なくとも以下の工程、すなわち

(i) 標的遺伝子のヌクレオチド配列と実質的に同一なヌクレオチド配列又はその一領域またはそれに相補的なヌクレオチド配列の多重コピー、好ましくはその縦列反復を含む一つ以上の分散した核酸分子又は外来性核酸分子を選択する工程、

30

(ii) 分散した核酸分子又は外来性核酸分子を含む合成遺伝子を作成する工程、

(iii) 該細胞、組織又は器官に該合成遺伝子を導入する工程、及び

(iv) mRNA産物の転写が専ら抑制又は低減されるのではないという条件付きで、標的遺伝子のmRNA産物の翻訳が改変されるのに充分な時間と条件の下で、該合成遺伝子を該細胞、組織又は器官中で発現させる工程、

を含む方法を提供する。

【 0 0 8 1 】

本明細書において「遺伝子(gene)」又は「遺伝子(genes)」に対する言及は最も広い文脈で解釈されるべきであり、

40

(i) 下記のものから成る古典的ゲノム遺伝子、すなわち、

転写及び/又は翻訳の調節配列及び/又はコード領域及び/又は非翻訳配列（即ちイントロン、5' - 及び 3' - の非翻訳配列）から構成される古典的なゲノム遺伝子、及び/又は

(ii) 該遺伝子のコード領域（即ちエキソン）及び5' - 及び3' - の非翻訳配列に対応するmRNA又はcDNA、及び/又は

(iii) 非翻訳配列及び/又は構造領域に発現特性を付与できる転写及び/又は翻訳の調節領域から成る異種のプロモーター配列をさらに任意に含むコード領域（即ちエキソン）に対応する該構造領域、

50

を含む。

【0082】

「遺伝子」という用語は、機能的産物の全部又は一部、特にセンス若しくはアンチセンスのmRNA産物、又はペプチド、オリゴペプチド若しくはポリペプチド又は生物活性タンパク質をコードする合成分子又は融合分子を記載するためにも使用される。

【0083】

「合成遺伝子」という用語は、本明細書で先に定義されたように、構造遺伝子配列に機能的に連結させた少なくとも一つ以上の転写及び／又は翻訳の調節配列を含むことが好ましい非天然産の遺伝子を指す。

【0084】

「構造遺伝子」という用語は、mRNAを產生するために伝達されることができ且つ任意的にペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド又は生物活性タンパク質分子をコードするヌクレオチド配列を指すと解釈されるべきである。当業者は、例えば、mRNAが機能的な翻訳開始シグナルを欠く場合、又はmRNAがアンチセンスmRNAである場合、全てのmRNAがペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質に翻訳され得るわけではないことを承知している。本発明はペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド又は生物活性タンパク質をコードできないヌクレオチド配列を含む合成遺伝子を明らかに包含する。特に、本発明者らは、このような合成遺伝子が原核生物又は真核生物の細胞、組織又は器官における標的遺伝子の発現を改変するのに有利でありうることを見出した。

10

【0085】

「構造遺伝子領域」という用語は、機能しうるように連結させたプロモーター配列の制御下に細胞、組織又は器官内で発現させる本明細書に記載の分散した核酸分子又は外来性核酸分子を含む合成遺伝子の部分を指す。構造遺伝子領域は単独のプロモーター配列又は多重のプロモーター配列の制御下で機能しうる一つ以上の分散した核酸分子及び／又は外来性核酸分子を含みうる。従って、合成遺伝子の構造遺伝子領域はアミノ酸配列をコードできるヌクレオチド配列又はそれに相補的なヌクレオチド配列を含みうる。この点で、本発明の実施で使用される構造遺伝子領域は、アミノ酸配列をコードするが機能的な翻訳開始コドン及び／又は機能的な翻訳終始コドンを欠き、結果として完全なオープン・リーディング・フレームを含まないヌクレオチド配列を含んでもよい。この文脈において、「構造遺伝子領域」という用語は、該遺伝子を発現する真核細胞中で通常翻訳されない遺伝子の5' - 上流又は3' - 下流の配列といった非コードヌクレオチド配列にまでも拡張される。

20

【0086】

従って、本発明の文脈において、構造遺伝子領域は、同一又は異なる遺伝子の二つ以上のオープン・リーディング・フレーム間の融合も含みうる。このような態様において、本発明は、一つの遺伝子の異なる非連続領域を標的化することにより該遺伝子の発現を調節するため、又は多重遺伝子ファミリーの異なる遺伝子などの幾つかの異なる遺伝子の発現を同時に調節するために使用されうる。動物細胞にとって非内因性であり且つ特にウイルス病原体に由来する二つ以上のヌクレオチド配列を含む融合核酸分子の場合、融合は、この幾つかの病原体における遺伝子の発現を標的化することにより該幾つかの病原体に対する同時免疫又は同時予防を付与するというさらなる利点を提供しうる。その代わりに又はそれに加えて、融合は、任意の病原体の一つ以上の遺伝子の発現を標的化することにより該病原体に対するより効果的な免疫を与える。

30

【0087】

本発明のこの側面の特に好ましい構造遺伝子領域は、少なくとも一つの翻訳可能なオープン・リーディング・フレームを含むものであり、より好ましくはさらに該オープン・リーディング・フレームの5'端（必ずしも構造遺伝子領域の5' - 末端とは限らないが）に位置する翻訳開始コドンを含む。この点で、構造遺伝子領域は少なくとも一つの翻訳可能なオープン・リーディング・フレーム及び／又はAUG若しくはATGの翻訳開始コドンを含み得るが、このような配列を含むことは、本発明が標的遺伝子の発現を調節するため

40

50

導入された核酸分子の翻訳を生じさせる必要があることを示唆するものではない。いかなる理論又は作用様式にも拘束されるものではないが、本核酸分子に少なくとも一つの翻訳可能なオーブン・リーディング・フレーム及び／又は翻訳開始コドンを含ませることは、そのmRNA転写産物の安定性を増大するのに役立つものであり、それにより、本発明の効率が改善される。

【0088】

本発明の合成遺伝子に関する構造遺伝子配列の最適な数は、該構造遺伝子配列のそれぞれの長さ、方向、及び互いの同一性の程度に応じてかなり変動する。例えば、当業者は、パリンドローム構造のヌクレオチド配列がインビボで本来不安定であることそしてこのような配列がインビボで組換えを起こす傾向があるため、逆反復ヌクレオチド配列を含む長い合成遺伝子を構築するには困難が伴うことを知っている。このような難点にも関わらず、本発明の合成遺伝子に含まれるべき構造遺伝子配列の最適な数は、過度の実験を行うことなく、リコンビナーゼ欠損の細胞系統を用い、組換え事象を除去又は最小限にするレベルまで反復配列の数を減らし、そして多重構造遺伝子配列の全長を許容される限界、好ましくは僅か5～10kb、より好ましくは僅か2～5kb、さらにより好ましくは長さを僅か0.5～2.0kbに保つことにより、本発明の合成遺伝子を構築するような標準的手法に従い、当業者によって経験的に決定されうる。

10

【0089】

構造遺伝子領域が二つ以上の分散した核酸分子又は外来性核酸分子を含む場合、本明細書では「多重構造遺伝子領域」または同様な用語を用いて言及する。明らかに、本発明は、好ましくは特定の構造遺伝子、分散した核酸分子又は外来性核酸分子、又はその断片の直列反復配列、逆反復配列又は分断されたパリンドローム配列を含む多重構造遺伝子領域の使用にまで拡張される。

20

【0090】

本合成遺伝子の多重構造遺伝子単位内に含まれる分散した核酸分子又は外来性核酸分子のそれは、同じ生物での異なる標的遺伝子と実質的に同一なヌクレオチド配列を含みうる。ウイルス標的遺伝子の発現を改变することにより合成遺伝子が細胞、組織又は器官における病原体、とりわけウイルス病原体に対する防御を提供することを意図する場合、このような配置は特に有用でありうる。例えば、多重構造遺伝子が、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、Niaプロテアーゼ、及びコートタンパク質を含むリストから選択される二つ以上の標的遺伝子又はウイルスの感染力、複製又は増殖に必須な他の標的遺伝子と実質的に同一なヌクレオチド配列（即ち、二つ以上の分散した核酸分子又は外来性核酸分子）を含みうる。しかし、この配置については、本合成遺伝子の多重構造遺伝子がプロモーター配列の制御下で発現するのとほぼ同じ時期に（又は後に）、実質的に同一の標的遺伝子（複数）が感染した細胞、組織又は器官内で正常に発現するように構造遺伝子単位が選択されることが好ましい。これは、ウイルス標的遺伝子が異なる感染段階で発現する場合、ウイルスの全生活環にわたって、多重構造遺伝子の発現を制御するプロモーターが細胞、組織又は器官における発現を行わせるように通常選択されることを意味する。

30

【0091】

分散した核酸分子又は外来性核酸分子の各配列単位に関しては、多重構造遺伝子の個々の単位は相互に対応して例えば、頭部から頭部、頭部から尾部、又は尾部から尾部の任意の方向で空間的に連結されうる、そしてこのような配置は全て本発明の範囲内にある。

40

【0092】

真核細胞での発現のため、合成遺伝子は、本発明の核酸分子に加えて、一般にプロモーター及び任意選択的に分散した核酸分子又は外来性核酸分子の発現を促進するように設計された他の調節配列を含む。

【0093】

本明細書における「プロモーター」に対する言及は、最も広い文脈で解釈されるべきであり、正確な転写の開始に必要とされるTATAボックスを含み、CCAATボックス配列及び発生上の及び／又は外部の刺激に応答して又は組織特異的な様式で遺伝子発現を変化

50

させる付加的調節因子（即ち、上流の活性化配列、エンハンサー及びサイレンサー）を備えた又は備えない古典的なゲノム遺伝子の転写調節配列を含む。プロモーターは、必ずではないが通常、その発現を制御する構造遺伝子領域の上流又は5'に位置する。さらに、プロモーターを含む調節因子は通常、遺伝子の転写の開始部位の2 kb内に位置する。

【0094】

本文脈において、「プロモーター」という用語は細胞における核酸分子の発現を付与し、活性化し、又は強化する合成分子又は融合分子又は誘導体を記述するためにも使用される。

【0095】

好みしいプロモーターは、センス分子の発現をさらに強化するために及び／又は該センス分子の空間的発現及び／又は時間的発現を改変するために一つ以上の特異的な調節因子のさらなるコピーを含みうる。例えば、銅誘導性を付与する調節因子はセンス分子を発現させる異種のプロモーター配列に隣接して配置されることにより、該分子の発現に銅誘導性を付与する。

10

【0096】

プロモーター配列の調節的制御の下に分散した核酸分子又は外来性核酸分子を配置することは、その発現がそのプロモーター配列により制御されるように該分子を配置することを意味する。プロモーターは一般的にそれが制御する遺伝子の5'（上流）に位置する。異種のプロモーター／構造遺伝子の組み合わせの構築において、天然の環境でのプロモーターとそれが制御する遺伝子、即ちプロモーターが見出される遺伝子との間の距離とほぼ同じ遺伝子転写開始部位からの距離にプロモーターを配置することが一般的に好みしい。当分野で周知のように、プロモーター機能を喪失することなく、この距離のある程度の変動は許容される。同様に、その制御下に置かれるべき異種遺伝子に関する調節配列因子の好みしい配置は、天然環境、即ち該因子が見出される遺伝子のその配置により定められる。また、当分野で周知のように、この距離のある程度の変動も起こり得る。

20

【0097】

本発明の合成遺伝子における使用に適したプロモーターの例としては、ウイルス、菌類、細菌、動物及び植物に由来するプロモーターであって、植物、動物、昆虫、菌類、酵母又は細菌の細胞で機能しうるプロモーターが挙げられる。このプロモーターは、構成的に構造遺伝子構成要素の発現を調節し、あるいは、発現が起こる細胞、組織又は器官に関して、又は発現が起こる発生段階に関して、又はとりわけ生理的ストレス、又は病原体、又は金属イオンなどの外部刺激に応答して異なって構造遺伝子構成要素の発現を調節しうる。

30

【0098】

このプロモーターは、少なくとも標的遺伝子が発現する時間の間中、より好みしくは細胞、組織又は器官で標的遺伝子の検出可能な発現の開始直前にも、真核生物の細胞、組織又は器官で核酸分子の発現を調節できることが好みしい。

【0099】

従って、強力な構成的プロモーターが又はウイルス感染若しくは標的遺伝子の発現の開始により誘導されうるプロモーターが本発明の目的には特に好みしい。

【0100】

40

植物及び動物で機能しうるプロモーターは本発明の合成遺伝子の使用に特に好みしい。好みしいプロモーターの例としては、バクテリオファージT7プロモーター、バクテリオファージT3プロモーター、SP6プロモーター、lacオペレーター・プロモーター、tacプロモーター、SV40後期プロモーター、SV40初期プロモーター、RSV-LTRプロモーター、CMV-IEプロモーター、CaMV35Sプロモーター、SCSVプロモーター、SCBVプロモーター等が挙げられる。

【0101】

標的遺伝子の発現と同時に起きる又は標的遺伝子の発現に先行する高レベルな発現のための好みしい必要条件を考慮すると、プロモーター配列は、とりわけCMV-IEプロモーター配列又はSV40初期プロモーター配列、SV40後期プロモーター配列、CaMV

50

3 S P ロモーター、又は S C B V プロモーターなどの強力な構成的プロモーターであることが極めて望ましい。当業者は、具体的に記載されたもの以外の別のプロモーター配列にも容易に気付くはずである。

【 0 1 0 2 】

本文脈において、「機能しうるよう連結させた」又は「制御の下で機能しうる」又は同様な語は、構造遺伝子領域又は多重構造遺伝子領域の発現が細胞、組織、器官又は生物全体において空間的に連結させたプロモーター配列の制御の下にあることを意味すると解釈されるべきである。

【 0 1 0 3 】

本発明の好ましい態様において、構造遺伝子領域（即ち、分散した核酸分子又は外来性核酸分子）又は多重構造遺伝子領域は、該遺伝子が転写される場合、翻訳されるなら、標的遺伝子又はその断片のポリペプチド産物をコードできるm R N A 産物が合成されるように、プロモーター配列に関してプロモーター方向に機能しうるよう連結させて配置される。
10

【 0 1 0 4 】

しかし、本発明はこのような配置の使用に制限されるわけではなく、本発明は明らかに、合成遺伝子及び遺伝的構築物の使用であって、少なくともそのm R N A 転写産物の一部が標的遺伝子又はその断片によってコードされるm R N A に相補的となるように、構造遺伝子領域又は多重構造遺伝子領域がプロモーター配列に関して「アンチセンス」方向に配置されるものである使用に拡張される。
20

【 0 1 0 5 】

分散した核酸分子、外来性の核酸分子又は多重構造遺伝子領域は標的遺伝子の縦列直列配列反復配列及び／又は逆反復配列を含むことは明らかであるから、上述の立体配置のあらゆる組み合わせが本発明により包含される。

【 0 1 0 6 】

本発明の別の態様において、構造遺伝子領域又は多重構造遺伝子領域は第一プロモーター配列及び第二プロモーター配列の両方に機能しうるよう連結される。該二つのプロモーターは、構造遺伝子領域または多重構造遺伝子領域の少なくとも一つの単位が第一プロモーター配列に関して「センス」方向に置かれ、且つ第二プロモーター配列に関して「アンチセンス」方向に置かれるよう、その遠位及び近位の末端に配置される。この態様によれば、第一プロモーターと第二プロモーターは、それらに結合する細胞転写因子に対する両者間の競合を防ぐために異なっていることも好ましい。この配置の利点は、細胞内での標的遺伝子の発現を低減させる際に、試験される各ヌクレオチド配列にとっての最適な方向を決定するために、第一プロモーターと第二プロモーターからの転写の影響が比較されることである。
30

【 0 1 0 7 】

合成遺伝子は、例えば転写終結配列など、効率的な転写のためのさらなる調節因子を含むことが好ましい。

【 0 1 0 8 】

「ターミネーター」という用語は、転写の終結を知らせる転写単位の末端にあるD N A 配列を指す。ターミネーターはポリアデニル化シグナルを含む3' - 非翻訳D N A 配列であり、ポリアデニル化シグナルは一次転写産物の3' - 末端にポリアデニレート配列の付加を促進させる。植物細胞内で活性なターミネーターが知られており、文献に記載されている。ターミネーターは細菌、真菌、ウイルス、動物及び／又は植物から単離しうるし又はデノボ合成しうる。

【 0 1 0 9 】

プロモーター配列と同様に、ターミネーターは使用が意図される細胞、組織又は器官で機能しうる任意のターミネーター配列でありうる。

【 0 1 1 0 】

本発明の合成遺伝子の使用に特に適切なターミネーターの例としては、中でも、S V 4 0
50

ポリアデニル化シグナル、HSV・TKポリアデニル化シグナル、CYC1ターミネーター、ADHターミネーター、SPAターミネーター、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノパリンシンターゼ(NOS)遺伝子ターミネーター、カリフラワー・モザイク・ウイルス(CaMV)35S遺伝子のターミネーター、トウモロコシ由来のzein遺伝子ターミネーター、ルビスコ小サブユニット(SSU)遺伝子ターミネーター配列、サブクローバー・スタント・ウイルス(SCSV)遺伝子配列ターミネーター、任意のrhc非依存性大腸菌ターミネーター、又はlacZアルファターミネーターが挙げられる。

【0111】

特に好ましい態様において、このターミネーターは、動物の細胞、組織又は器官で機能しうるSV40ポリアデニル化シグナル又はHSV・TKポリアデニル化シグナル、植物の細胞、組織又は器官で活性なオクトピンシンターゼ(OCS)又はノパリンシンターゼ(NOS)のターミネーター、又は原核細胞で活性なlacZアルファターミネーターである。

【0112】

当業者は、本発明を実施する際に使用に適しうるさらなるターミネーター配列に気付くであろう。このような配列は過度の実験をすることなく容易に使用される。

【0113】

本明細書に記載される合成遺伝子又はそれを含む遺伝子構築物を細胞に導入する手段(即ち、トランスフェクション又は形質転換)は当業者に周知である。

【0114】

さらなる別の態様において、二つ以上の構造遺伝子領域又は多重構造遺伝子領域を含む遺伝子構築物が使用される。この構造遺伝子領域の各々はそれ自体のプロモーター配列の制御下で機能しうるように配置される。本明細書に記載される他の態様と同様に、各構造遺伝子領域の方向は標的遺伝子の発現に対する調節効果が最大になるよう変更されうる。

【0115】

この態様によれば、構造遺伝子単位の発現を制御するプロモーターは、細胞転写因子とRNAポリメラーゼに対するそれらの間の競合を減少させるため異なるプロモーター配列であることが好ましい。好ましいプロモーターは先に言及したものから選択される。

【0116】

当業者は、別個のプロモーター配列からの発現を調節するため、前述したような各構造遺伝子の配置又は立体配置をどのように改変すべきかを知っている。

【0117】

前述の合成遺伝子は、例えば、それが発現する細胞、組織又は器官内で合成遺伝子の検出を容易にするため、検出可能なマーカー酵素をコードするマーカスクレオチド配列又はその機能的類似体又はその誘導体を含めることによりさらに改変できる。この態様にしたがって、マーカスクレオチド配列は、翻訳可能な型で存在し、例えば一つ以上の任意の構造遺伝子の翻訳産物との融合ポリペプチドとして、又は非融合ポリペプチドとして発現される。

【0118】

当業者は、本明細書に記載される合成遺伝子の作製方法、及び必要なときに所望の条件下で特定の細胞又は細胞のタイプでのそれを発現させるための必要条件を承知している。特に、本発明を実施するのに必要とされる遺伝子操作は本明細書に記載される遺伝子構築物またはその誘導体を大腸菌細胞などの原核細胞又は植物細胞又は動物細胞で増やすことを必要とすることは当業者に知られている。

【0119】

本発明の合成遺伝子は、とりわけ細胞、ウイルス粒子又はリポソームなどの適切な担体内に任意選択的に含まれる遺伝子構築物の形態の直鎖状DNAとして、改変することなく、適切な細胞、組織又は器官に導入されうる。遺伝子構築物を作成するため、本発明の合成遺伝子は、後に導入される宿主の細胞、組織又は器官内で維持及び/又は複製及び/又は発現できるバクテリオファージベクター、ウイルスベクター又はプラスミド、コスミド又

10

20

30

40

50

は人工染色体ベクターなどの適切なベクター又はエピソーム分子に挿入される。

【0120】

従って、本発明のさらなる側面は、本明細書に記載の一つ以上の態様の合成遺伝子、及び一つ以上の複製起点及び／又は選択可能なマーカー遺伝子配列を少なくとも含む遺伝子構築物を提供する。

【0121】

遺伝子構築物は、ウイルス病原体に対する耐性特性を付与するほかに、真核細胞へ新規な遺伝的特性を導入するための該細胞の形質転換に特に適している。このようなさらなる新規な特性は、異なる遺伝子構築物中に、又は本明細書に記載の合成遺伝子を含む同じ遺伝子構築物上に導入されうる。当業者は、特に遺伝子操作及び組織培養の必要性の減少並びに費用効果の増大という点で、単独の遺伝子構築物にこのような付加的特性及び本明細書に記載の合成遺伝子をコードする遺伝子配列を含めることの大きな利点を認識するはずである。

10

【0122】

細菌での使用に適した複製起点又は選択可能なマーカー遺伝子は、真核細胞での発現又はそれへの導入、又は真核細胞のゲノムへの取り込みが意図される遺伝子構築物に含まれるこれらの遺伝子配列から物理的に分離されているのが通常である。

【0123】

特に好ましい態様においては、複製起点は細菌細胞で機能しうるものであって、pUC又はC01E1の起点を含み、又は複製起点は真核生物の細胞、組織で機能しうるものであり、より好ましくは2ミクロン(2μm)の複製起点又はSV40の複製起点を含む。

20

【0124】

本明細書で使用されるとき、「選択可能なマーカー遺伝子」という用語は、本発明の遺伝子構築物又はその誘導体でトランスフェクション又は形質転換される細胞の同定及び／又は選択を容易にするために、それを発現する細胞に表現型を付与する任意の遺伝子を含む。

【0125】

本明細書で意図される適切な選択可能なマーカー遺伝子には、とりわけ、アンピシリン耐性遺伝子(Amp^r)、テトラサイクリン耐性遺伝子(Tc^r)、細菌性カナマイシン耐性遺伝子(Kan^r)、ゼオシン耐性遺伝子(ゼオシンはブレオマイシン・ファミリーの薬物であり、インビトロゲン社の商標である)、抗生素質のオーレオバシディンAに対する耐性を付与するAURI-C遺伝子、フォスフィノスリシン耐性遺伝子、ネオマイシン・フォスフォトランスフェラーゼ遺伝子(nptII)、ハイグロマイシン耐性遺伝子、-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子又はルシフェラーゼ遺伝子が含まれる。

30

【0126】

選択可能なマーカー遺伝子はnptII遺伝子又はKan^r遺伝子又は緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子であることが好ましい。

【0127】

当業者は本発明の実施に有用な他の選択可能マーカー遺伝子を承知しており、本発明は選択可能マーカー遺伝子の性質によって制限されるものではない。

40

【0128】

本発明は本質的に本明細書に記載の遺伝子構築物であって、原核生物又は真核生物における遺伝子構築物の維持及び／又は複製並びに／又は真核細胞又は真核生物のゲノムへの遺伝的構築物またはその一部の取り込みを目的とするさらなる遺伝子配列を含む遺伝子構築物全てに及ぶ。

【0129】

分散した又は外来の核酸分子と同様に、上記の標準的方法は、標的遺伝子の発現を調節する目的で合成遺伝子及び遺伝子構築物を細胞、組織又は器官に導入するために用いてもよ

50

く、例えば、リポソームに媒介されるトランスフェクション若しくは形質転換、弱毒化されたウイルス粒子若しくは細菌細胞による細胞の形質転換、細胞接合、当分野で周知の又はアウスベルら(1992年)により記載された形質転換又はトランスフェクションの手法が用いられる。

【0130】

植物の組織または細胞に組換えDNAを導入するためのさらなる手段には、CaCl₂及びその変形を用いる形質転換、特にハナハン(1983年)によって記載された方法、プロトプラストへの直接的なDNA取り込み(クレンスら, 1982、パスズコヴスキーラ, 1984)、プロトプラストへのPEG媒介取り込み(アームストロングら, 1990)、微小粒子銃撃、電気穿孔(フロムら, 1985)、DNAのマイクロインジェクション(クロスウェイら, 1986)、組織の外植片又は細胞の微小粒子銃撃(クリストウラ、1988、サンフォード, 1988)、核酸による組織の減圧浸入、又は植物の場合、アンら(1985年)、ヘレラ-エストレラら(1983a、1983b、1985)により実質的に記述されたアグロバクテリウムから植物組織へのT-DNA媒介性の導入が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0131】

細胞の微小粒子銃撃では、微小粒子が細胞に射ち込まれ形質転換細胞を生ずる。本発明を実施する際に、任意の適切な銃撃細胞形質転換方法及び装置が使用されうる。典型的な装置及び手法はストンプラ(米国特許第5,122,466号)及びサンフォードとヴォルフ(米国特許第4,945,050号)により開示されている。銃撃性の形質転換手法を用いる場合、遺伝子構築物は形質転換される細胞中で複製できるプラスミドに組込まれうる。

【0132】

このような系での使用に適する微小粒子の例には1から5μmの金の球が挙げられる。DNA構築物は沈降などの任意の適切な技術により微小粒子に沈着されうる。

【0133】

本発明のさらなる態様において、本明細書に記載の合成遺伝子及び遺伝子構築物は発現する細胞のゲノムへの組み込みに適合される。当業者は、宿主細胞のゲノムへの遺伝子配列又は遺伝子構築物の組み込みを達成するためにある付加的な遺伝子配列が必要となることを承知している。植物の場合、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのTiプラスミドのT-DNAに由来する左側と右側の境界配列が一般に必要とされる。

【0134】

本発明は、本明細書に記載の合成遺伝子を含む単離された細胞、組織若しくは器官又は同遺伝子を含む遺伝子構築物にもさらに拡大される。さらに、本発明は、該細胞、組織及び器官に由来する再生された組織、器官及び生物体、並びにそれらの繁殖体及び子孫にも拡大される。

【0135】

例えば、植物はホルモンを含有する培地上で形質転換された植物の細胞、又は組織又は器官から再生しうる。再生された植物は、形質転換細胞と非形質転換細胞のキメラ、クローニングの形質転換体(例えば、発現カセットを含むよう形質転換された全細胞)、形質転換された組織及び形質転換されていない組織の接木(例えば、柑橘種において形質転換されていない若枝に接木される形質転換された台木)などの多様な形態をとりうる。形質転換植物は、クローニング繁殖又は古典的な育種技術などによる種々の方法により繁殖しうる。例えば、第一世代(即ちT1)の形質転換植物は同型接合の第二世代(T2)の形質転換植物をもたらすように自家受粉させてもよく、さらにT2植物は古典的な育種技術により繁殖させてもよい。

【0136】

さらに、本発明は以下の非限定的な実施例を参照することにより記述される。

【0137】

実施例1

10

20

30

40

50

C M V プロモーター配列及び / 又は S V 4 0 L プロモーター配列に連結させた
B E V ポリメラーゼ遺伝子配列を含む遺伝子構築物

1 . 市販のプラスミド

プラスミド p B l u e s c r i p t I I (S K +)

プラスミド p B l u e s c r i p t I I (S K +) はストラタジーン社から購入でき、 L a c Z プロモーター配列及び l a c Z - アルファ転写ターミネーターを含み、その中に構造遺伝子配列の挿入用に多重クローニング部位を備える。このプラスミドは C o l E 1 と f 1 の複製起点及びアンピシリン耐性遺伝子をさらに含む。

【 0 1 3 8 】

プラスミド p S V L

10

プラスミド p S V L はファルマシア社から購入でき、 S V 4 0 後期プロモーター配列の供給源として役立つ。 p S V L のスクレオチド配列もゲンバンク受託番号 U 1 3 8 6 8 として一般に入手できる。

【 0 1 3 9 】

プラスミド p C R 2 . 1

プラスミド p C R 2 . 1 はインビトロゲン社から購入でき、 L a c Z プロモーター配列及び l a c Z - 転写ターミネーターを含み、それらの間に構造遺伝子配列の挿入用にクローニング部位を備えている。プラスミド p C R 2 . 1 は、ポリメラーゼ連鎖反応の間に T a q ポリメラーゼによりしばしば合成される A - オーバーハングにより核酸断片をクローニングするよう設計されている。この様式でクローニングされた P C R 断片は両側に二つの E c o R I 部位が隣接している。このプラスミドは C o l E 1 と f 1 の複製起点並びにカナマイシン耐性及びアンピシリン耐性の遺伝子をさらに含む。

20

【 0 1 4 0 】

プラスミド p E G F P - N 1 · M C S

プラスミド p E G F P - N 1 · M C S (図 1 ; クローンテック社) は、野生型の緑色蛍光タンパク質 (G F P 、 プラッセルラ , 1 9 9 2 、 チャルフィー , 1 9 9 4 、 イノウエヒツジ , 1 9 9 4) をより明るい蛍光に最適化させた赤色シフトした変異体をコードするオープン・リーディング・フレームに機能しうるように連結させた C M V - I E プロモーターを含む。 p E G F P - N 1 · M C S によってコードされたこの特定の G F P 変異体はコルマックらにより開示された (1 9 9 6 年) 。プラスミド p E G F P - N 1 · M C S は、 C M V - I E プロモーターと G F P のオープン・リーディング・フレームとの間に位置する B g l I I I 部位と B a m H I 部位を含む多重クローニング部位及び多数の他の制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む。多重クローニング部位にクローニングされた構造遺伝子は、機能的な翻訳開始部位を欠く場合、このような構造遺伝子の配列はタンパク質レベルで発現しない (即ち翻訳されない) けれども、転写レベルでは発現する。多重クローニング部位に挿入された機能的な翻訳開始部位を含む構造遺伝子配列は、 G F P をコードする配列と共に枠をそろえてクローニングされる場合、 G F P 融合ポリペプチドとして発現する。このプラスミドは、 C M V - I E プロモーター配列から転写された m R N A の 3' 末端の適切なプロセシングを指示するため、 G F P のオープン・リーディング・フレームの下流に S V 4 0 ポリアデニル化シグナルをさらに含む。このプラスミドは、動物細胞で機能する S V 4 0 の複製起点と、カナマイシン、ネオマイシン又は G 4 1 8 で形質転換細胞を選択するための T n 5 (図 1 の K a n / n e o) に由来するネオマイシン / カナマイシン耐性遺伝子及び H S V チミジン・キナーゼ・ポリアデニル化シグナル (図 1 の H S V · T K ポリ (A)) に機能しうるように連結させた S V 4 0 初期プロモーター (図 1 の S V 4 0 · E P) を含むネオマイシン耐性遺伝子と、細菌細胞で機能する p U C 1 9 の複製起点 (図 1 の p U C · O r i) と、そして一本鎖 D N A 生産のための f 1 の複製起点 (図 1 の f 1 · O r i) とをさらに含む。

30

【 0 1 4 1 】

2 . 発現カセット

プラスミド p C M V . c a s s

40

50

プラスミド p CMV . c a s s (図 2) は、 CMV - I E プロモーター配列の制御下で構造遺伝子配列を発現させるための発現カセットである。プラスミド p CMV . c a s s は以下のように G F P のオープン・リーディング・フレームを欠失させることにより p E G F P - N 1 · M C S から誘導した。プラスミド p E G F P - N 1 · M C S を P i n A I と N o t I で消化し、 P f u I ポリメラーゼを用いて平滑末端化した後、再連結した。構造遺伝子配列は、 P i n A I 部位を欠くことを除いて p E G F P - N 1 · M C S の多重クローニング部位と同一である多重クローニング部位を用いて p CMV . c a s s 中へクローニングする。

【 0 1 4 2 】

プラスミド p CMV . S V 4 0 L . c a s s

10

プラスミド p CMV . S V 4 0 L . c a s s (図 3) は、 CMV - I E プロモーター配列と S V 4 0 後期プロモーター配列が同方向の転写を指示することができるよう、合成のポリ A 部位と、 S a l I 断片としてプラスミド p CMV . c a s s (図 2) の S a l I 部位にサブクローニングされたプラスミド p C R . S V 4 0 L (図 4) に由来する S V 4 0 L 後期プロモーター配列とを含む。従って、 S V 4 0 プロモーター配列の 5' 末端のこの合成ポリ (A) 部位は、このプラスミドの CMV - I E プロモーターから発現される構造遺伝子に対する転写ターミネーターとして用いられる。このプラスミドは、 S V 4 0 後期プロモーターと合成ポリ (A) 部位との間に存在する多重クローニング部位により該構造遺伝子の挿入を可能とする (図 5) 。この多重クローニング部位は CMV - I E プロモーター及び S V 4 0 後期プロモーターの後方に位置し、 B a m H I 部位及び B g I I I 部位を含む。

20

【 0 1 4 3 】

プラスミド p CMV . S V 4 0 L R . c a s s

プラスミド p CMV . S V 4 0 L R . c a s s は、 CMV - I E プロモーター又は S V 4 0 後期プロモーターが望みのままにセンス又はアンチセンスの方向で構造遺伝子又は多重構造遺伝子単位を転写しうるよう、 S a l I 断片としてプラスミド p CMV . c a s s (図 2) の S a l I 部位にサブクローニングされたプラスミド p C R . S V 4 0 L に由来する S V 4 0 L 後期プロモーター配列を含む。多重クローニング部位は、このプラスミドにおいて反対方向の CMV - I E プロモーター配列と S V 4 0 後期プロモーター配列の間に位置し、構造遺伝子配列の導入を容易にする。このプラスミドから構造遺伝子配列を発現させるためには、このプラスミドで反対方向の CMV - I E プロモーター配列と S V 4 0 後期プロモーター配列との間に位置する転写終結配列はないので、 3' 末端に位置するそれ自身の転写終結配列が導入されなければならない。 p CMV . S V 4 0 L R . c a s s に導入される構造遺伝子配列又は多重構造遺伝子単位は下記のように 5' と 3' のポリアデニル化シグナルの両方を含むことが好ましい、即ち

30

(i) 構造遺伝子配列又は多重構造遺伝子単位が CMV - I E プロモーター配列からセンスの方向で及び / 又は S V 4 0 後期プロモーターからアンチセンスの方向で発現される場合、 5' ポリアデニル化シグナルはアンチセンスの方向にあり、 3' ポリアデニル化シグナルはセンスの方向にあり、そして

(ii) 構造遺伝子配列又は多重構造遺伝子単位が CMV - I E プロモーター配列からアンチセンスの方向で及び / 又は S V 4 0 後期プロモーターからセンスの方向で発現される場合、 5' ポリアデニル化シグナルはセンスの方向にあり、 3' ポリアデニル化シグナルはアンチセンスの方向にある。

40

【 0 1 4 4 】

その代わり又はそれに加えて、適切な方向を向いたターミネーター配列は図 4 に示すように CMV プロモーター及び S V 4 0 L プロモーターの 5' 末端に位置しうる。

【 0 1 4 5 】

又は、プラスミド p CMV . S V 4 0 L R . c a s s をさらに改変して、 CMV - I E プロモーター又は S V 4 0 プロモーターの配列のいずれかからセンス又はアンチセンスの方向でそれらの間に位置する任意の構造遺伝子の発現を促進するよう適切な方向で CMV -

50

I E プロモーター配列と S V 4 0 プロモーター配列との間に位置する 2 つのポリアデニル化シグナルを含む誘導体プラスミドを作成する。本発明は明らかにこのような誘導体を包含する。

【 0 1 4 6 】

又は、適切な方向を向いたターミネーターは、アンチセンス方向の 2 つのプロモーターのそれぞれが読み込まれた後に転写終結が起こるよう、C M V プロモーター及び S V 4 0 L プロモーターの上流に配置することができよう。

【 0 1 4 7 】

3 . 中間構築物

p C R . B g 1 - G F P - B a m プラスミド

10

p C R . B g 1 - G F P - B a m プラスミド(図 5)は、l a c Z プロモーターの制御下で機能しうるように配置された p E G F P - N 1 · M C S プラスミド(図 1)に由来する G F P オープン・リーディング・フレームの内部領域を含む。このプラスミドを作成するために、G F P オープン・リーディング・フレームの領域を増幅プライマーの B g 1 - G F P (配列番号 : 1) と G F P - B a m (配列番号 : 2) とを用いて p E G F P - N 1 · M C S から増幅し、p C R 2 . 1 プラスミドにクローニングした。p C R . B g 1 - G F P - B a m プラスミドにおける内部 G F P をコードする領域は機能的な翻訳開始コドン及び終始コドンを欠く。

【 0 1 4 8 】

p B S I I (S K +) . E G F P プラスミド

20

p B S I I (S K +) . E G F P プラスミド(図 6)は、l a c Z プロモーターの制御下で機能しうるように配置された p E G F P - N 1 · M C S プラスミド(図 1)に由来する E G F P オープン・リーディング・フレームを含む。このプラスミドを作成するために、p E G F P - N 1 · M C S の E G F P コード領域を N o t I / X h o I 断片として切り出し、p B l u e s c r i p t I I (S K +) プラスミドの N o t I / X h o I クローニング部位にクローニングした。

【 0 1 4 9 】

p C M V . E G F P プラスミド

p C M V . E G F P プラスミド(図 7)は C M V - I E プロモーター配列の制御下で E G F P 構造遺伝子を発現できる。このプラスミドを作成するため、p B S I I (S K +) . E G F P プラスミド由来の E G F P 配列を B a m H I / S a c I 断片として切り出し、p C M V . c a s s プラスミド(図 2)の B g 1 I I / S a c I 部位にクローニングした。

30

【 0 1 5 0 】

p C R . S V 4 0 L プラスミド

p C R . S V 4 0 L プラスミド(図 8)は p C R 2 . 1 (ストラタジーン社)にクローニングされた p S V L プラスミド(ゲンバンク受託番号 U 1 3 8 6 8 、ファルマシア社)に由来する S V 4 0 後期プロモーターを含む。このプラスミドを作成するため、p C M V . c a s s への増幅された D N A 断片のサブクローニングを容易にするための S a 1 I クローニング部位を含むプライマーの S V 4 0 - 1 (配列番号 : 3) 及び S V 4 0 - 2 (配列番号 : 4) を用いて、S V 4 0 後期プロモーターを増幅した。このプライマーは 5' 末端に合成のポリ (A) 部位も含むため、増幅産物は S V 4 0 プロモーター配列の 5' 末端に合成のポリ (A) 部位を含む。

40

【 0 1 5 1 】

p C R . B E V . 1 プラスミド

B E V の R N A 依存性 R N A ポリメラーゼをコードする領域は、標準的な増幅条件の下で B E V - 1 (配列番号 : 5) と B E V - 2 (配列番号 : 6) と称するプライマーを用いて、同ポリメラーゼをコードする全長 c D N A クローンから 1 3 8 5 b p の D N A 断片として増幅された。増幅された D N A は B E V - 1 プライマー配列に由来する 5' - B g 1 I I 制限酵素部位及び B E V - 2 プライマー配列に由来する 3' B a m H I 制限酵素部位を含んでいた。さらに、B E V - 1 プライマー配列は 1 5 ~ 1 7 位に遺伝子工学的に導入され

50

た翻訳開始シグナル 5' - A T G - 3' を含むため、増幅された B E V ポリメラーゼ構造遺伝子は B E V ポリメラーゼをコードするスクレオチド配列とともに枠内に開始部位を含む。こうして、増幅された B E V ポリメラーゼ構造遺伝子は B E V ポリメラーゼをコードする配列に対してすぐ上流に（即ち並置して） A T G 開始コドンを含む。増幅された D N A に翻訳終始コドンはない。このプラスミドは図 9 に示す。

【 0 1 5 2 】

p C R . B E V . 2 プラスミド

完全な B E V ポリメラーゼをコードする領域はプライマーの B E V - 1 と B E V - 3 を用いて同ポリメラーゼをコードする全長の c D N A クローンから増幅された。プライマー B E V - 3 は 5 位から 1 0 位までに B a m H I 制限酵素部位及び 1 1 位から 1 3 位に翻訳終止シグナルの補完物を含む。結果として、翻訳開始シグナルと翻訳終止シグナルとを含むオープン・リーディング・フレームが B g 1 II と B a m H I の制限部位の間に含められた。この増幅断片を p C R 2 . 1 (ストラタジーン社) にクローニングして p C R 2 . B E V . 2 プラスミド（図 1 0 ）を作成した。

10

【 0 1 5 3 】

p C R . B E V . 3 プラスミド

翻訳できない B E V ポリメラーゼ構造遺伝子を、増幅プライマーの B E V - 3 (配列番号 : 7) と B E V - 4 (配列番号 : 8) とを用いて全長の B E V ポリメラーゼ c D N A クローンから増幅した。プライマー B E V - 4 は 5 ~ 1 0 位の B g 1 II クローニング部位を含み、この B g 1 II 部位の下流の配列は B E V ポリメラーゼ遺伝子のスクレオチド配列に相同である。プライマーの B E V - 3 と B E V - 4 で増幅された D N A 産物には機能的な A T G 開始コドンは存在しない。この B E V ポリメラーゼはポリタンパク質の一部として発現され、その結果、この遺伝子に A T G 翻訳開始部位は存在しない。この増幅された D N A をプラスミド p C R 2 . 1 (ストラタジーン社) にクローニングして p C R . B E V . 3 プラスミド（図 1 1 ）を得た。

20

【 0 1 5 4 】

p C M V . E G F P . B E V 2 プラスミド

p C M V . E G F P . B E V 2 プラスミド（図 1 2 ）は、 B g 1 III / B a m H I 断片としての p C R . B E V . 2 由来の B E V ポリメラーゼ配列を p C M V . E G F P の B a m H I 部位中へクローニングすることにより作成した。

30

【 0 1 5 5 】

4 . 対照プラスミド

p C M V . B E V . 2 プラスミド

p C M V . B E V . 2 プラスミド（図 1 3 ）は、 C M V - I E プロモーター配列の制御下で B E V ポリメラーゼの完全なオープン・リーディング・フレームを発現できる。 p C M V . B E V . 2 を作成するために、 p C R . B E V . 2 由来の B E V ポリメラーゼ配列を、 B g 1 II から B a m H I までの断片としてセンス方向で B g 1 III / B a m H I で消化した p C M V . c a s s (図 2) 中にサブクローニングした。

【 0 1 5 6 】

p C M V . B E V . 3 プラスミド

40

p C M V . B E V . 3 プラスミド（図 1 4 ）は、 C M V - I E プロモーター配列の制御の下でセンス方向で翻訳され得ない B E V ポリメラーゼ構造遺伝子を発現する。 p C M V . B E V n t を作成するため、 p C R . B E V . 3 由来の B E V ポリメラーゼ配列を B g 1 III / B a m H I 断片としてセンス方向で B g 1 III / B a m H I で消化した p C M V . c a s s 中にサブクローニングした（図 2 ）。

【 0 1 5 7 】

p C M V . V E B プラスミド

p C M V . V E B プラスミド（図 1 5 ）は、 C M V - I E プロモーター配列の制御の下でアンチセンスの B E V ポリメラーゼの m R N A を発現する。 p C M V . V E B プラスミドを作成するため、 p C R . B E V . 2 由来の B E V ポリメラーゼ配列を B g 1 II から B a

50

m H Iまでの断片としてアンチセンス方向でB g 1 II / B a m H Iで消化したp C M V . c a s s (図2)中にサブクローニングした。

【0158】

p C M V . B E V . G F P プラスミド

p C M V . B E V . G F P プラスミド(図16)は、p C R . B g 1 - G F P - B a m 由来のG F P断片をB g 1 II / B a m H I断片として、B a m H Iで消化したp C M V . B E V . 2中にクローニングすることにより構築した。このプラスミドは幾つかの実験における対照として役立ち、そして中間構築物としても役立つ。

【0159】

p C M V . B E V . S V 4 0 - L . 0 プラスミド

10

p C M V . B E V . S V 4 0 - L . 0 プラスミド(図17)は、p C M V . S V 4 0 L . c a s s プラスミドのC M V - I E プロモーター配列とS V 4 0 後期プロモーターの配列の間にセンス方向で挿入されたp C R . B E V . 2由来の翻訳可能なB E Vポリメラーゼ構造遺伝子を含む。p C M V . B E V . S V 4 0 L - O プラスミドを作成するため、B E Vポリメラーゼ構造遺伝子をB g 1 IIからB a m H I断片としてB g 1 IIで消化したp C M V . S V 4 0 L . c a s s D N A 中にサブクローニングした。

【0160】

p C M V . O . S V 4 0 L . B E V プラスミド

p C M V . O . S V 4 0 L . B E V プラスミド(図18)は、p C M V . S V 4 0 L . c a s s プラスミドに存在する縦列のC M V - I E プロモーター配列とS V 4 0 後期プロモーター配列との下流にクローニングされたp C R . B E V . 2 プラスミドに由来する翻訳可能なB E Vポリメラーゼ構造遺伝子を含む。p C M V . O . S V 4 0 L . B E V プラスミドを作成するため、B E Vポリメラーゼ構造遺伝子をB g 1 IIからB a m H Iまでの断片としてセンス方向でB a m H Iで消化したp C M V . S V 4 0 L . c a s s D N A 中にサブクローニングした。

20

【0161】

p C M V . O . S V 4 0 L . V E B プラスミド

p C M V . O . S V 4 0 L . V E B プラスミド(図19)は、p C M V . S V 4 0 L . c a s s プラスミドに存在する縦列のC M V - I E プロモーター配列とS V 4 0 後期プロモーター配列の下流にクローニングされたp C R . B E V . 2 プラスミドに由来するアンチセンスのB E Vポリメラーゼ構造遺伝子を含む。p C M V . O . S V 4 0 L . V E B プラスミドを作成するため、B E Vポリメラーゼ構造遺伝子をB g 1 IIからB a m H Iまでの断片としてアンチセンス方向でB a m H Iで消化したp C M V . S V . 4 0 L . c a s s D N A 中にサブクローニングした。

30

【0162】

5. 試験プラスミド

p C M V . B E V × 2 プラスミド

p C M V . B E V × 2 プラスミド(図20)は、C M V - I E プロモーター配列の制御の下で完全なB E Vポリメラーゼのオープン・リーディング・フレームの直列反復を含む。少なくとも真核細胞では、C M V - I E プロモーターのより近くに位置するオープン・リーディング・フレームは翻訳可能である。p C M V . B E V × 2 を作成するために、p C R . B E V . 2 プラスミド由来のB E Vポリメラーゼ構造遺伝子をB g 1 IIからB a m H Iまでの断片としてセンス方向で既にその中に存在するB E Vポリメラーゼ構造遺伝子のすぐ下流にあるB a m H Iで消化したp C M V . B E V . 2 中にサブクローニングした。

40

【0163】

p C M V . B E V × 3 プラスミド

p C M V . B E V × 3 プラスミド(図21)は、C M V - 1 E プロモーターの制御下でB E Vポリメラーゼの三つの完全なオープン・リーディング・フレームの直列反復を含む。p C M V . B E V × 3 を作成するため、p C R . B E V . 2 由来のB E Vポリメラーゼ断片を、B g 1 II / B a m H I断片としてセンス方向で既にその中に存在するB E Vポリメ

50

ラーゼ配列のすぐ下流にある p CMV . BEV × 2 の BamHI 部位中にクローニングした。

【 0 1 6 4 】

p CMV . BEV × 4 プラスミド

p CMV . BEV × 4 プラスミド(図22)は、CMV - IE プロモーターの制御の下で BEV ポリメラーゼの四つの完全なオープン・リーディング・フレームの直列反復を含む。p CMV . BEV × 4 を作成するため、p CR . BEV . 2 由来の BEV ポリメラーゼ断片を、Bg1II / BamHI 断片として、センス方向で、既にその中に存在する BEV ポリメラーゼ配列のすぐ下流にある p CMV . BEV × 3 の BamHI 部位中にクローニングした。

10

【 0 1 6 5 】

p CMV . BEV . SV40L . BEV プラスミド

p CMV . BEV . SV40L . BEV プラスミド(図23)は、機能しうるよう配置され且つそれぞれ CMV - IE プロモーター配列と SV40 後期プロモーター配列の制御の下にある二つの BEV ポリメラーゼ構造遺伝子を含む多重構造遺伝子単位を含む。p CMV . BEV . SV40L . BEV プラスミドを作成するため、p CR . BEV . 2 に存在する翻訳可能な BEV ポリメラーゼ構造遺伝子を、Bg1II から BamHI までの断片としてセンス方向で、BamHI で消化した p CMV . BEV . SV40L - O に存在する SV40 後期プロモーター配列の後方にサブクローニングした。

20

【 0 1 6 6 】

p CMV . BEV . SV40L . VEB プラスミド

p CMV . BEV . SV40L . VEB プラスミド(図24)は、機能しうるよう配置され且つそれぞれ CMV - IE プロモーター配列と SV40 後期プロモーター配列の制御の下にある二つの BEV ポリメラーゼ構造遺伝子を含む多重構造遺伝子単位を含む。p CMV . BEV . SV40L . VEB プラスミドを作成するため、p CR . BEV . 2 に存在する翻訳可能な BEV ポリメラーゼ構造遺伝子を、Bg1II から BamHI までの断片としてアンチセンス方向で、BamHI で消化した p CMV . BEV . SV40L - O に存在する SV40 後期プロモーター配列の後方にサブクローニングした。このプラスミドでは、BEV ポリメラーゼ構造遺伝子は CMV - IE プロモーターの制御の下でセンス方向で発現して翻訳可能な mRNA を産生する一方、この BEV ポリメラーゼ構造遺伝子は SV40 プロモーターの制御の下でも発現してアンチセンスの mRNA 種を産生する。

30

【 0 1 6 7 】

p CMV . BEV . GFP . VEB プラスミド

p CMV . BEV . GFP . VEB プラスミド(図25)は、逆反復の各 BEV 構造遺伝子配列間に GFP オープン・リーディング・フレーム(スタッファー断片)の挿入によって分断された BEV 構造遺伝子の逆反復即ちパリンドロームを含む。p CMV . BEV . GFP . VEB プラスミドを作成するため、p CR . Bg1 - GFP - Bam 由来の GFP スタッファー断片を、まず Bg1II から BamHI までの断片として BamHI で消化した p CMV . BEV . 2 中にセンス方向でサブクローニングして p CMV . BEV . GFP 中間プラスミドを得た。該 BEV ポリメラーゼをコードする配列と該 GFP をコードする配列とは 5' - Bg1II から BamHI - 3' までの同じ断片内に含まれる。次に、p CMV . BEV . 2 由来の BEV ポリメラーゼ構造遺伝子を、Bg1II から BamHI までの断片としてアンチセンス方向で、BamHI で消化した p CMV . BEV . GFP 中にクローニングした。p CMV . BEV . GFP . VEB プラスミドの CMV - IE プロモーター配列により近い BEV ポリメラーゼ構造遺伝子は少なくとも真核細胞中で翻訳され得る。

40

【 0 1 6 8 】

p CMV . EGFP . BEV2 . PFG プラスミド

p CMV . EGFP . BEV2 . PFG プラスミド(図26)は、逆反復の各 GFP 構造遺伝子の間に BEV ポリメラーゼ配列を挿入することによって分断された GFP パリン

50

ドロームを含む。このプラスミドを作成するため、p C R . B g 1 - G F P - B a m 由来のG F P 断片を、B g 1 I I / B a m H I 断片として、C M V プロモーターに関してアンチセンス方向で、p C M V . E G F P . B E V 2 のB a m H I 部位中にクローニングした。

【 0 1 6 9 】

p C M V . B E V . S V 4 0 L R プラスミド

p C M V . B E V . S V 4 0 L R プラスミド(図27)は、機能しうるように配置され且つ反対方向のC M V - I E プロモーター配列とS V 4 0 後期プロモーター配列により別々に制御されている完全なB E V ポリメラーゼのオープン・リーディング・フレームを含む構造遺伝子を含み、それにより、全長のB E V ポリメラーゼ構造遺伝子の少なくとも両方の鎖に由来するB E V ポリメラーゼの転写産物を潜在的に生産可能である。p C M V . B E V . S V 4 0 L R プラスミドを作成するために、p C R . B E V . 2 に存在する翻訳可能なB E V ポリメラーゼ構造遺伝子を、B g 1 I I からB m H I までの断片として、B E V のオープン・リーディング・フレームがC M V - I E プロモーター配列に関してセンス方向に存在するように、p C M V . S V 4 0 L R . c a s s の唯一つのB g 1 I I 部位にサブクローニングした。

【 0 1 7 0 】

当業者は、このクローニング戦略を用いて、p C R . B E V . 2 に由来するB E V ポリメラーゼ断片がC M V - I E プロモーター配列に関してアンチセンス方向に挿入されているプラスミドを作成することが可能であることを認めるはずである。本発明はこのような遺伝的構築物をも包含する。

【 0 1 7 1 】

実施例 2

C M V プロモーター配列及び / 又は S V 4 0 L プロモーター配列に機能しうる

ように連結されたブタの - 1 , 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ

(G a l t) 構造遺伝子の配列又は配列群を含む遺伝子構築物

1 . 市販のプラスミド

p c D N A 3 プラスミド

p c D N A 3 プラスミドは、インビトロゲン社から購入でき、C M V - I E プロモーター及びB G H p A 転写ターミネーターを含み、構造遺伝子配列を挿入するための多重クローニング部位を備えている。さらに、このプラスミドはC o l E 1 とf 1 の複製起点及びネオマイシン耐性とアンピシリン耐性の遺伝子を含む。

【 0 1 7 2 】

2 . 中間プラスミド

p c D N A 3 . G a l t プラスミド

p c D N A 3 . G a l t プラスミド(プレサゲン社、南オーストラリア州、オーストラリア、図28)はp c D N A 3 プラスミド(インビトロゲン社)であり、C M V - I E プロモーター配列の制御の下で機能しうるブタのアルファ - 1 , 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ(G a l t)遺伝子をコードするc D N A 配列を含むので、G a l t が該プラスミドから発現され得る。p c D N A 3 . G a l t プラスミドを作成するために、ブタのアルファ - 1 , 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子のc D N A をE c o R I 断片としてp c D N A 3 のE c o R I クローニング部位中にクローニングした。このプラスミドはC o l E 1 とf 1 の複製起点及びネオマイシンとアンピシリンの耐性遺伝子をさらに含む。

【 0 1 7 3 】

3 . 対照プラスミド

p C M V . G a l t プラスミド

p C M V . G a l t プラスミド(図29)はC M V - I E プロモーター配列の制御の下でG a l t 構造遺伝子を発現することができる。p C M V . G a l t プラスミドを作成するため、p c D N A 3 . G a l t プラスミド由来のG a l t 配列をE c o R I 断片として切り出し、p C M V . c a s s プラスミド(図2)のE c o R I 部位にセンス方向でクロ-

10

20

30

40

50

ニングした。

【0174】

p CMV . EGFP . Gal t プラスミド

p CMV . EGFP . Gal t プラスミド(図30)はCMV - IEプロモーター配列の制御の下でGal t 融合ポリペプチドとしてGal t 構造遺伝子を発現できる。p CMV . EGFP . Gal t プラスミドを作成するため、p CMV . Gal t (図29)由来のGal t 配列をBgl II / Bam HI 断片として切り出し、p CMV . EGFP のBam HI 部位中にクローニングした。

【0175】

p CMV . Gal t . GFP プラスミド

p CMV . Gal t . GFP プラスミド(図31)は、Gal t · c DNA をp CDNA 3由来のEco RI 断片としてセンス方向でEco RI で消化したp CMV . EGFP 中にクローニングすることにより作成した。このプラスミドは対照としても中間構築物としても役立つ。

【0176】

p CMV . Gal t . SV40 L . O プラスミド

p CMV . Gal t . SV40 L . O プラスミド(図32)は、p CMV . SV40 L . c ass に存在するCMVプロモーターの下流にクローニングされたGal t 構造遺伝子を含む。このプラスミドを作成するため、p CMV . Gal t 由来のGal t · c DNA 断片を、Bgl II / Bam HI としてBgl II で消化したp CMV . SV40 L . c ass 中にセンス方向でクローニングした。

【0177】

p CMV . O . SV40 L . t1aG プラスミド

p CMV . O . SV40 L . t1aG プラスミド(図33)は、p CMV . SV40 L . c ass に存在するSV40 L プロモーターの下流にアンチセンス方向でGal t 構造遺伝子クローンを含む。このプラスミドを作成するため、p CMV . Gal t 由来のGal t · c DNA 断片を、Bgl II / Bam HI としてBam HI で消化したp CMV . SV40 L . c ass 中にアンチセンス方向でクローニングした。

【0178】

p CMV . O . SV40 L . Gal t プラスミド

p CMV . O . SV40 L . Gal t プラスミド(図34)は、p CMV . SV40 L . c ass に存在するSV40 L プロモーターの下流にクローニングされたGal t 構造遺伝子を含む。このプラスミドを作成するため、p CMV . Gal t 由来のGal t · c DNA 断片を、Bgl II / Bam HI 断片としてBam HI で消化したp CMV . SV40 L . c ass 中にセンス方向でクローニングした。

【0179】

4 . 試験プラスミド

p CMV . Gal t x 2 プラスミド

p CMV . Gal t x 2 プラスミド(図35)は、CMV - IEプロモーター配列の制御の下にGal t オープン・リーディング・フレームの直列反復を含む。少なくとも真核細胞において、CMV - IEプロモーターのより近くに位置するオープン・リーディング・フレームは翻訳可能である。p CMV . Gal t x 2 を作成するため、p CMV . Gal t 由来のGal t 構造遺伝子を、Bgl II / Bam HI 断片として切り出し、p CMV . Gal t のBam HI クローニング部位中にセンス方向でクローニングした。

【0180】

p CMV . Gal t x 4 プラスミド

p CMV . Gal t x 4 プラスミド(図36)は、CMV - IEプロモーター配列の制御の下にGal t オープン・リーディング・フレームの四つの直列反復を含む。少なくとも真核細胞において、CMV - IEプロモーターのより近くに位置するオープン・リーディング・フレームは翻訳可能である。p CMV . Gal t x 4 を作成するため、p CMV .

10

20

30

40

50

G a l t × 2 由来の G a l t × 2 配列を、 B g 1 I I / B a m H I 断片として切り出し、 p C M V . G a l t × 2 の B a m H I クローニング部位中にセンス方向でクローニングした。

【 0 1 8 1 】

p C M V . G a l t . S V 4 0 L . G a l t プラスミド

p C M V . G a l t . S V 4 0 L . G a l t プラスミド(図37)は、 G a l t の二つのセンスの転写産物を発現するよう設計される。すなわち、一方は C M V プロモーターにより駆動されたものであり、他方は S V 4 0 L プロモーターにより駆動されたものである。このプラスミドを作成するため、 p C M V . G a l t 由来の G a l t · c D N A 断片を B g 1 I I / B a m H I 断片として B g 1 I I で消化した p C M V . O . S V 4 0 . G a l t 中にセンス方向でクローニングした。 10

【 0 1 8 2 】

p C M V . G a l t . S V 4 0 L . t 1 a G プラスミド

p C M V . G a l t . S V 4 0 L . t 1 a G プラスミド(図38)は、 C M V プロモーターにより駆動され G a l t のセンスの転写産物を発現し、かつ、 S V 4 0 L プロモーターにより駆動されアンチセンスの転写産物を発現するよう設計される。このプラスミドを作成するため、 p C M V . G a l t 由来の G a l t · c D N A 断片を B g 1 I I / B a m H I 断片として B g 1 I I で消化した p C M V . O . S V 4 0 . t 1 a G 中にセンス方向でクローニングした。 20

【 0 1 8 3 】

p C M V . G a l t . G F P . t 1 a G プラスミド

p C M V . G a l t . G F P . t 1 a G プラスミド(図39)は、逆反復の各 G a l t 構造遺伝子の間が G F P 配列の挿入により分断された G a l t パリンドロームを含む。このプラスミドを作成するため、 p C M V . G a l t 由来の G a l t · c D N A を、 B g 1 I I / B a m H I 断片として、 p C M V . G a l t . G F P の B a m H I 部位に C M V プロモーターに関してアンチセンス方向でクローニングした。 20

【 0 1 8 4 】

p C M V . E G F P . G a l t . P F G プラスミド

p C M V . E G F P . G a l t . P F G プラスミド(図40)は、逆反復の各 G F P 構造遺伝子の間が G a l t 配列の挿入により分断された G F P パリンドロームを含み、その発現は C M V プロモーターにより駆動される。このプラスミドを作成するため、 p C M V . G a l t 由来の G a l t 配列を、 B g 1 I I / B a m H I 断片として B a m H I で消化した p C M V . E G F P にセンス方向でクローニングして中間体の p C M V . E G F P . G a l t (未表示)を作成し、その後、 p C R . B g 1 - p C M V . E G F P . G a l t 由来の G F P 配列をアンチセンス方向でさらにクローニングした。 30

【 0 1 8 5 】

p C M V . G a l t . S V 4 0 L R プラスミド

p C M V . G a l t . S V 4 0 L R プラスミド(図41)は、 p C M V . S V 4 0 L R . c a s s 発現カセットにおいて反対方向の C M V プロモーターと S V 4 0 L プロモーターとの間にクローニングされた G a l T · c D N A 配列を発現するよう設計される。このプラスミドを作成するため、 p C M V . G a l t 由来の G a l t 配列を B g 1 I I / B a m H I 断片として B g 1 I I で消化した p C M V . S V 4 0 L R . c a s s に 3 5 S プロモーターに関してセンス方向でクローニングした。 40

【 0 1 8 6 】

実施例 3

3 5 S プロモーター配列及び / 又は S C B V プロモーター配列に機能しうる

ように連結させた P V Y · N i a 配列を含む遺伝子構築物

1. 二元ベクター

p A R T 2 7 プラスミド

p A R T 2 7 プラスミドは二元ベクターであり、 p A R T 2 7 発現カセットに適合するよ 50

う特別に設計されている。これは、大腸菌とアグロバクテリウム・ツメファシエンスの両方の細菌の複製起点、細菌の選択用のスペクティノマイシン耐性遺伝子、アグロバクテリウムから植物細胞へのDNA転移用の左側及び右側のT-DNA境界領域、及び形質転換した植物細胞を選択するためのカナマイシン耐性カセットを含む。カナマイシン耐性カセットは両T-DNA境界領域の間に位置し、pART27は、両T-DNA境界領域の間にクローニングされるべきpART7などのベクター内で調製された構築物のクローニングを可能とする唯一のNotI制限部位をも含む。pART27の構築はグリーブ、エイ・ピー。(1992年)に記述されている。

【0187】

このベクターにNotI挿入物をクローニングする場合、二つの挿入方向が得られ得る。以下の実施例全てにおいて、前記pART7構築物における35Sプロモーターの方向に関する同じ挿入方向を選択した。これは、異なる挿入方向をもつ異なる構築物の比較から生じうる実験上的人工産物を最小限にするために行った。

【0188】

2. 市販のプラスミド

pBC(KS-)プラスミド

pBC(KS-)プラスミドはストラタジーン社から購入でき、構造遺伝子配列の挿入用の多重クローニング部位を備え、lacZプロモーター配列及びlacZ-アルファ転写ターミネーターを含む。このプラスミドはColE1とf1の複製起点及びクロラムフェニコール耐性遺伝子をさらに含む。

【0189】

pSP72プラスミド

pSP72プラスミドはプロメガ社から購入でき、構造遺伝子配列の挿入用の多重クローニング部位を含む。さらに、このプラスミドはColE1の複製起点及びアンピシリン耐性遺伝子を含む。

【0190】

3. 発現カセット

pART7プラスミド

pART7プラスミドは35Sプロモーターの後方にクローニングされた配列の発現を駆動するよう設計された発現カセットである。これはクローニングを助けるためのポリリンカー及びオクティピンシンターゼのターミネーター領域を含む。35S発現カセットの両側は、唯一のNotI部位を含むpART27のような二元発現ベクターへのクローニングを行える二つのNotI制限部位が隣接している。この構築はグリーブ、エイ・ピー。(1992年)に記載され、地図は図42に示す。

【0191】

pART7.35S.SCBV.cassプラスミド

p35S.CMV.cassプラスミドは、一つのプラスミド中にクローニングされる二つの異なる遺伝子配列を発現するよう設計された。このプラスミドを作成するため、nosターミネーターとSCBVプロモーターに対応する配列をPCRにより増幅した後、35SプロモーターとOC-Sとの間にあるpART7のポリリンカーにクローニングした。

【0192】

得られるプラスミドは以下の因子の配列を有する。

35Sプロモーター - ポリリンカー1 - NOSターミネーター - SCBVプロモーター - ポリリンカー2 - OC-Sターミネーター。

【0193】

ポリリンカー1にクローニングされた配列の発現は35Sプロモーターにより制御され、ポリリンカー2にクローニングされた配列の発現はSCBVプロモーターにより制御される。

【0194】

NOSターミネーター配列は下記の二つのオリゴヌクレオチドを用いてpAHС27プラ

10

20

30

40

50

スミド(クリステンセンとクエイル, 1996年)から増幅した。

N O S 5 ' (前向きプライマー、配列番号: 9)

5 ' - G G A T T C C C G G G A C G T C G C G A A T T C C C C G A T C G T T C
- 3 '、及び

N O S 3 ' (逆向きプライマー、配列番号: 10)

5 ' - C C A T G G C C A T A T A G G C C C G A T C T A G T A A C A T A G - 3 '。

【0195】

N O S 5 ' の 1 から 17 と N O S 3 ' の 1 から 15 のヌクレオチド残基は、さらなる制限部位を加えることによる構築物調製を補助するよう設計された付加的なヌクレオチドを表す。N O S 5 ' では、これらは B a m H I 、 S m a I 、 A a t I I 及び N r u I 部位の最初の4塩基であり、N O S 3 ' では、これらは N c o I と S f i I 部位である。各オリゴヌクレオチドに対する残りの配列は、 p A H C 2 7 における N O S 配列の 5 ' 末端と 3 ' 末端にそれぞれ相同である。

【0196】

S C B V プロモーター配列は下記の二つのオリゴヌクレオチドを用いて p S c B V - 2 0 プラスミド(トザファーら, 1998年)から増幅した。

S C B V 5 ' : 5 ' - C C A T G G C C T A T A T G G C C A T T C C C C A C A T T C
A A G - 3 ' (配列番号: 11)、及び

S C B V 3 ' : 5 ' - A A C G T T A A C T T C T A C C C A G T T C C A G A G - 3 ' (配列番号: 12)。

【0197】

S C B V 5 ' の 1 から 17 のヌクレオチド残基は構築物の調製を助けるよう設計された N c o I と S f i I の制限部位をコードし、残りの配列は S C M V プロモーター領域の上流配列に相同である。S C B V 3 ' の 1 から 9 のヌクレオチド残基は構築物の調製を助けるよう設計された P s p 1 0 4 6 1 と H p a I の制限部位をコードし、残りの配列は S C B V の転写開始部位近くにある配列の逆向きかつ相補的配列に相同である。

【0198】

P C R を用いて p S c B V - 2 0 から増幅された配列及び p S c B V - 2 0 を p C R 2 . 1 (インビトロゲン社)にクローニングして得られた配列は、それぞれ p C R . N O S と p C R . S C B V であった。 S m a I / S f i I で切断した p C R . N O S と S f i I / H p a I で切断した p C R . S C B V を S m a I で切断した p A R T 7 に連結し、適切な方向をもつプラスミドを選択して p A R T 7 . 3 5 S . S C B V . c a s s と名づけた。この構築物の地図は図 4 3 に示す。

【0199】

4. 中間構築物

p B C . P V Y プラスミド

P V Y ゲノムの領域は鋳型として P V Y に感染したタバコから単離された逆転写 R N A を用いて標準的なプロトコルで P C R により増幅し、 p G E M 3 (ストラタジーン社) プラスミド中にクローニングして p G E M . P V Y を作成した。P V Y 株〇配列(受託番号 D 1 2 5 3 9 、ゲンバンク)の 1 5 3 6 ~ 2 2 7 0 位の S a l I / H i n d I I I 断片に対応する p G E M . P V Y 由来の S a l I / h i n d I I I 断片を次に p B C プラスミド(ストラタジーン社)にサブクローニングして p B C . P V Y (図 4 4)を作成した。

【0200】

p S P 7 2 . P V Y プラスミド

p S P 7 2 . P V Y プラスミドは、 E c o R I / S a l I で切断した p S P 7 2 (プロメガ社)中に p B C . P V Y 由来の E c o R I / S a l I 断片を挿入することにより調製した。この構築物は P V Y 挿入物を挟んで両側にさらなる制限部位を含んでいる。これらの制限部位は後の操作を助けるために用いられた。この構築物の地図は図 4 5 に示す。

【0201】

C l a p B C . P V Y プラスミド

10

20

30

40

50

C₁a · pB_C · PVY プラスミドは、pSP72 · PVY 由来の C₁aI / SalI 断片を C₁aI / SalI で切断した pB_C (ストラタジーン社) 中に挿入することにより調製した。この構築物は PVY 挿入物を挟んで両側にさらなる制限部位を含む。これらの制限部位は後の操作を助けるために用いられた。この構築物の地図は図 4 6 に示す。

【0202】

pB_C · PVY × 2 プラスミド

pB_C · PVY × 2 プラスミドは pB_C · PVY に由来する PVY 配列の二つの直列の頭 - 尾反復を含む。このプラスミドは AccI で切断した pB_C · PVY 中に pSP72 · PVY 由来の AccI / C₁aI · PVY 断片をクローニングすることにより作成した。このプラスミドは図 4 7 に示す。

10

【0203】

pSP72 · PVY × 2 プラスミド

pSP72 · PVY × 2 プラスミドは pB_C · PVY に由来する PVY 配列の二つの直列の頭 - 尾反復を含む。このプラスミドは AccI で切断した pSP72 · PVY 中に pB_C · PVY 由来の AccI / C₁aI · PVY 断片をクローニングすることにより作成した。このプラスミドは図 4 8 に示す。

【0204】

pB_C · PVY × 3 プラスミド

pB_C · PVY × 3 プラスミドは pB_C · PVY に由来する PVY 配列の三つの直列の頭 - 尾反復を含む。このプラスミドは AccI で切断した pB_C · PVY × 2 中に pSP72 · PVY 由来の AccI / C₁aI · PVY 断片をクローニングすることにより調製した。このプラスミドは図 4 9 に示す。

20

【0205】

pB_C · PVY × 4 プラスミド

pB_C · PVY × 4 プラスミドは pB_C · PVY に由来する PVY 配列の四つの直列の頭 - 尾反復を含む。このプラスミドは AccI で切断した pB_C · PVY × 2 中に AccI / C₁aI 断片としての pSP72 · PVY × 2 由来の PVY 配列の直列反復をクローニングすることにより調製した。このプラスミドは図 5 0 に示す。

【0206】

pB_C · PVY · LN_{YV} プラスミド

30

PVY 配列の直列のパリンドロームを作成する試みは全て失敗した。おそらくこのような配列の配置は広く使用されている大腸菌のクローニング宿主では不安定らしい。しかしながら、分断されたパリンドロームは安定であることが分かった。

【0207】

PVY 配列の分断されたパリンドロームを作成するために、約 360 bp の「スタッフター」断片を PVY 配列の下流の C₁a · pBV · PVY 中に挿入した。このスタッフター断片はつぎのように作製した。

【0208】

4 b のウイルス遺伝子を含むことが知られているレタス・ネクロッティック・イエローズ · ウイルス (LN_{YV}) のゲノム RNA (ダイツゲンら, 1989 年) から調製された cDNA ライブラリーから当初得られたクローンを下記のプライマーを用いて PCR により増幅した。

40

LN_{YV} 1 : 5' - ATGGGATCCGTTATGCCAAGAACAGAAGGA - 3'
(配列番号 : 13)、及び

LN_{YV} 2 : 5' - TGTGGATCCCTAACGGACCCGATG - 3' (配列番号 : 14)。

【0209】

これらのプライマーの最初の 9 ヌクレオチドは BamHI 部位をコードし、残りのヌクレオチドは LN_{YV} の 4 b の遺伝子配列に相同である。

【0210】

50

増幅後、この断片を p C R 2 . 1 (ストラタジーン社) の E c o R I 部位にクローニングした。この E c o R I 断片を C l a · p B C . P V Y の E c o R I 部位にクローニングして図 5 1 に示す p B C . P V Y . L N Y V 中間プラスミドを作成した。

【 0 2 1 1 】

p B C . P V Y . L N Y V . P V Y プラスミド

p B C . P V Y . L N Y V . P V Y プラスミドは P V Y 配列の分断された直列反復を含む。このプラスミドを作成するために、 S m a I で消化した p B C . P V Y . L N Y V 中に p S P 7 2 由来の H p a I / H i n c I I 断片をクローニングし、センス方向をもつプラスミドを単離した。この構築物の地図は図 5 2 に示す。

【 0 2 1 2 】

10

p B C . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミド

p B C . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミドは P V Y 配列の部分的に分断されたパリンドロームを含む。パリンドロームの一方のアームは p B C . P V Y 由来の P V Y 全配列を含み、他方のアームは p S P 7 2 . P V Y の E c o R V 部位と H i n c I I 部位間の配列に対応する、 P V Y 由来の該配列の一部を含む。このプラスミドを作成するために、 p S P 7 2 . P V Y 由来の E c o R V / H i n c I I 断片を、 S m a I で消化した p B C . P V Y . L N Y V 中にクローニングし、所望の方向をもつプラスミドを単離した。この構築物の地図は図 5 3 に示す。

【 0 2 1 3 】

20

p B C . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミド

p B C . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミドは P V Y 配列の分断されたパリンドロームを含む。このプラスミドを作成するために、 S m a I で消化した p B C . P V Y . L N Y V 中に p S P 7 2 . 由来の H p a I / H i n c I I 断片をクローニングし、アンチセンス方向をもつプラスミドを単離した。この構築物の地図は図 5 4 に示す。

【 0 2 1 4 】

5. 対照プラスミド

p A R T 7 . P V Y プラスミド及び p A R T 2 7 . P V Y プラスミド

p A R T 7 . P V Y プラスミド(図 5 5)は 3 5 S プロモーターにより駆動される P V Y 配列を発現するよう設計された。このプラスミドは、他の全ての構築物がそれと比較される、これらの実験での対照構築物として役立つ。このプラスミドを作成するため、 C l a I で消化した p A R T 7 中に C l a · p B C . P V Y 由来の C l a I / A c c I 断片をクローニングし、 P V Y ゲノムに関してセンスの P V Y 配列を発現することが予期されるプラスミドが選択された。 3 5 S プロモーター、 P V Y 配列及び O C S ターミネーターから成る配列を N o t I 断片として切り出し、 N o t I で消化した p A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを選択して p A R T 2 7 . P V Y と名づけた。

30

【 0 2 1 5 】

p A R T 7 . 3 5 S . P V Y . S C B V . O プラスミド及び p A R T 2 7 . 3 5 S . P V Y . S C B V . O プラスミド

p A R T 7 . 3 5 S . P V Y . S C B V . O プラスミド(図 5 6)を、トランシジェニック植物における 1 個のプラスミドからの多重構築物の共発現のための対照として役立つよう設計した。 3 5 S プロモーターは P V Y のセンス配列を発現するよう設計し、一方、 S C B V プロモーターは空とした。このプラスミドを作成するため、 C l a · p B C . P V Y 由来の P V Y 断片を、 X h o I / E c o R I 断片として、 X h o I / E c o R I で消化した p A R T 7 . 3 5 S . S C B V . c a s s 中にクローニングして p 3 5 S . P V Y . S C B V > O を作成した。センスの P V Y 配列を駆動する 3 5 S プロモーター及び N O S ターミネーター、及び S C B V プロモーター、及び O C S ターミネーターから成る配列を、 N o t I 断片として切り出し、 p A R T 2 7 中にクローニングして所望の挿入方向を持つプラスミドを単離し p A R T 2 7 . 3 5 S . P V Y . S C B V . O と名づけた。

40

【 0 2 1 6 】

p A R T 7 . 3 5 S . O . S C B V . P V Y プラスミド及び p A R T 2 7 . 3 5 S . O .

50

S C B V . P V Y プラスミド

p A R T 7 . 3 5 S . O . S C B V . P V Y プラスミド(図57)は、トランスジェニック植物における1個のプラスミドからの多重構築物の共発現のためのさらなる対照として作用するよう設計された。発現可能な配列は35Sプロモーターの後方にはクローニングせず、一方、S C B V プロモーターはP V Y のセンス断片の発現を駆動した。このプラスミドを作成するため、C l a · p B C . P V Y 由来のP V Y 断片を、C l a I 断片として、C l a I で消化したp A R T 7 . 3 5 S . S C B V . c a s s 中にクローニングし、センス方向にP V Y 配列を含むプラスミドを単離してp 3 5 S . O . S C B V . P V Y と名付けた。35Sプロモーター及びN O S ターミネーター、及びセンスのP V Y 配列を駆動するS C B V プロモーター及びO C S ターミネーターから成る配列をN o t I 断片として切り出し、p A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを単離してp A R T 2 7 . 3 5 S . O . S C B V . P V Y と名づけた。

【0217】

p A R T 7 . 3 5 S . O . S C B V . Y V P プラスミド及びp A R T 2 7 . 3 5 S . O . S C B V . Y V P プラスミド

p A R T 7 . 3 5 S . O . S C B V . Y V P プラスミド(図58)は、トランスジェニック植物における1個のプラスミドからの多重構築物の共発現のためのさらなる対照として作用するよう設計した。発現可能な配列は35Sプロモーターの後方にはクローニングせず、一方、S C B V プロモーターはP V Y のアンチセンス断片の発現を駆動した。このプラスミドを作成するため、C l a · p B C . P V Y 由来のP V Y 断片を、C l a I 断片として、C l a I で消化したp 3 5 S . S C B V . c a s s 中にクローニングし、アンチセンス方向にP V Y 配列を含むプラスミドを単離し、p 3 5 S . O . S C B V . Y V P と名付けた。35Sプロモーター及びN O S ターミネーター、及びセンスのP V Y 配列を駆動するS C B V プロモーター、及びO C S ターミネーターから成る配列を、N o t I 断片として切り出し、p A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを単離してp A R T 2 7 . 3 5 S . O . S C B V . Y V P と名づけた。

【0218】

6. 試験プラスミド

p A R T 7 . P V Y × 2 プラスミド及びp A R T 2 7 . P V Y × 2 プラスミド

p A R T 7 . P V Y × 2 プラスミド(図59)は、トランスジェニック植物で35Sプロモーターにより駆動されるP V Y 配列の直列反復を発現するよう設計された。このプラスミドを作成するため、p B C . P V Y × 2 由来の直列反復を、X h o I / B a m H I 断片として、X h o I / B a m H I で切断したp A R T 7 中にクローニングした。35Sプロモーター、P V Y の直列反復、及びO C S ターミネーターから成る配列を、p A R T 7 . P V Y × 2 からN o t I 断片として切り出し、N o t I で消化したp A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを選択してp A R T 2 7 . P V Y × 2 と名づけた。

【0219】

p A R T 7 . P V Y × 3 プラスミド及びp A R T 2 7 . P V Y × 3 プラスミド

p A R T 7 . P V Y × 3 プラスミド(図60)は、トランスジェニック植物で35Sプロモーターにより駆動される三つのP V Y 配列の直列反復を発現するよう設計された。このプラスミドを作成するため、p B C . P V Y × 3 由来の直列反復を、X h o I / B a m H I 断片として、X h o I / B a m H I で切断したp A R T 7 中にクローニングした。35Sプロモーター、P V Y の直列反復、及びO C S ターミネーターから成る配列を、p A R T . P V Y × 3 からN o t I 断片として切り出し、N o t I で消化したp A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを選択してp A R T 2 7 . P V Y × 3 と名づけた。

【0220】

p A R T 7 . P V Y × 4 プラスミド及びp A R T 2 7 . P V Y × 4 プラスミド

p A R T 7 . P V Y × 4 プラスミド(図61)は、トランスジェニック植物で35Sプロ

10

20

30

40

50

モーターにより駆動される四つの P V Y 配列の直列反復を発現するよう設計された。このプラスミドを作成するため、p B C . P V Y × 4 由来の直列反復を、X h o I / B a m H I 断片として、X h o I / B a m H I で切断した p A R T 7 中にクローニングした。3 S S プロモーター、P V Y の直列反復、及び O C S ターミネーターから成る配列を、p A R T 7 . P V Y × 3 から N o t I 断片として切り出し、N o t I で消化した p A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを選択して p A R T 2 7 . P V Y × 3 と名づけた。

【 0 2 2 1 】

p A R T 7 . P V Y . L N Y V . P V Y プラスミド及び p A R T 2 7 . P V Y . L N Y V . P V Y プラスミド

10

p A R T 7 . P V Y . L N Y V . P V Y プラスミド(図62)は、トランスジェニック植物で3 S S プロモーターにより駆動される、P V Y 配列の分断された直列反復を発現するよう設計された。この構築物は、p B C . P V Y . L N Y V . P V Y 由来の P V Y の分断された直列反復を、X h o I / X b a I 断片として、X h o I / X b a I で消化した p A R T 7 中にクローニングすることにより調製した。3 S S プロモーター、P V Y 配列の分断された直列反復、及び O C S ターミネーターから成る配列を、p A R T 7 . P V Y . L N Y V . P V Y から N o t I 断片として切り出し、N o t I で消化した p A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを選択して p A R T 2 7 . P V Y . L N Y V . P V Y と名づけた。

【 0 2 2 2 】

20

p A R T 7 . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミド及び p A R T 2 7 . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミド

p A R T 7 . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミド(図63)は、トランスジェニック植物で3 S S プロモーターにより駆動される P V Y 配列の部分的に分断されたパリンドロームを発現するよう設計された。この構築物は、p B C . P V Y . L N Y V . Y V P 由来の P V Y 配列の部分的に分断されたパリンドロームを、X h o I / X b a I 断片として、X h o I / X b a I で消化した p A R T 7 中にクローニングすることにより調製した。3 S S プロモーター、P V Y 配列の部分的に分断されたパリンドローム、及び O C S ターミネーターから成る配列を、p A R T 7 . P V Y . L N Y V . Y V P から N o t I 断片として切り出し、N o t I で消化した p A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを選択して p A R T 2 7 . P V Y . L N Y V . Y V P と名づけた。

30

【 0 2 2 3 】

p A R T 7 . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミド及び p A R T 2 7 . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミド

p A R T 7 . P V Y . L N Y V . Y V P プラスミド(図64)は、トランスジェニック植物で3 S S プロモーターにより駆動される P V Y 配列の分断されたパリンドロームを発現するよう設計された。この構築物は、p B C . P V Y . L N Y V . Y V P 由来の P V Y 配列の分断されたパリンドロームを、X h o I / X b a I 断片として、X h o I / X b a I で消化した p A R T 7 中にクローニングすることにより調製した。3 S S プロモーター、P V Y 配列の分断されたパリンドローム、及び O C S ターミネーターから成る配列を、p A R T 7 . P V Y . L N Y V . Y V P から N o t I 断片として切り出し、p A R T 2 7 中にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを選択して p A R T 2 7 . P V Y . L N Y V . Y V P と名づけた。

40

【 0 2 2 4 】

p A R T 7 . 3 S S . P V Y . S C B V . Y V P プラスミド及び p A R T 2 7 . 3 S S . P V Y . S C B V . Y V P プラスミド

p A R T 7 . 3 S S . P V Y . S C B V . Y V P プラスミド(図65)は、トランスジェニック植物でセンス構築物とアンチセンス構築物を共発現するよう設計された。このプラスミドを作成するため、C l a · p B C . P V Y 由来の P V Y 断片を、X h o I / E c o R I 断片として、X h o I / E c o R I で消化した p 3 S S . S C B V . O . S C B V .

50

YVP中にクローニングした。センスのPVY配列を駆動する35Sプロモーター、及びNOSターミネーター、及びアンチセンスのPVYを駆動するSCBVプロモーター、及びOCSターミネーターから成る配列を、NotI断片として切り出し、PART27にクローニングし、所望の挿入方向を持つプラスミドを単離してPART27.35S.PVY.SCBV.YVPと名づけた。

【0225】

pART7.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3プラスミド及びpART27.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3プラスミド

pART7.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3プラスミド(図66)は、トランスジェニック植物でPVYのセンス反復とアンチセンス反復を共発現するよう設計された。このプラスミドを作成するため、ClapBC.PVYx3由来の三重直列PVY反復を、ClalI/AccI断片として、ClalIで消化したp35S.SCBV.cass中にクローニングし、アンチセンス方向をもつプラスミドを単離することにより、中間体のpART7.35S.O.SCBV.YVPx3を構築した。p35S.PVYx3.SCBV.YVPx3のため、ClalI/pBC.PVYx3由来の三重直列PVY反復を、KpnI/SmaI断片として、KpnI/SmaIで消化したp35S.O.SCBV.YVPx3中にクローニングしてp35S.PVYx3.SCBV.YVPx3を作成した。両方のプロモーターとターミネーター、及び直列のPVY反復を含む配列を、NotI断片として単離し、pART27中にクローニングした。適切な方向を持つプラスミドを選択してpART27.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3と名づけた。

【0226】

pART7.PVYx3.LNYV.YVPx3プラスミド及びpART27.PVYx3.LNYV.YVPx3プラスミド

pART7.PVYx3.LNYV.YVPx3プラスミド(図67)は、分断されたパリンドロームとしてのPVY配列の三重反復を発現するよう設計された。このプラスミドを作成するため、pBC.PVY.LNYV.YVP由来のPVY.LNYV.YVP断片を、AccI/ClalI断片として、pART7.PVYx2.pART7.35S.PVYx3.LNYV.YVPx3プラスミド中にクローニングすることにより中間体のpART7x3.PVY.LNYV.YVを構築し、この中間構築物に、pBC.PVYx2由来のさらなるPVY直列反復を、AccI/ClalI断片として、ClalIで消化したpART7x3.PVY.LNYV.YVP中にクローニングした。35Sプロモーター、全PVY配列、及びOCSターミネーターを含むpART7.35S.PVYx3.LNYV.YVPx3由来の配列を、NotI断片として切り出し、NotIで消化したpART27中にクローニングした。適切な方向を持つプラスミドを選択してpART27.35S.PVYx3.LNYV.YVPx3と名づけた。

【0227】

プラスミドpART7.PVYマルチ及びプラスミドpART27.PVYマルチ

プラスミドpART7.35S.PVYマルチ(図68)はトランスジェニック植物でより高いオーダーのPVY配列の直列反復領域を発現するよう設計された。PVYに由来する72bpのPVY.Nia領域のより高いオーダーの直列反復は、以下の二つの一部相補的なオリゴヌクレオチドをアニーリングすることにより調製した。

PVY1:

5' - T A A T G A G G G A T G A T G T C C C T A C C T T T A A T T G G C A G A A A
T T T C T G T G G A A A G A C A G G G A A A T C T T T C G G C A T T T - 3' (配列番号: 15)、及び

PVY2:

5' - T T C T G C C A A T T A A A G G T A G G G A C A T C A T C C T C A T T A A
A A T G C C G A A A G A T T T C C C T G T C T T T C C A C A G A A A T - 3' (配列番号: 16)。

10

20

30

40

50

【0228】

このオリゴヌクレオチドをT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、加熱し、ゆっくり冷却して自己アニーリングさせ、T4DNAリガーゼで連結し、クレノウポリメラーゼで末端を充填し、pCR2.1(インビトロゲン社)中にクローニングした。多重反復を含むプラスミドを単離し、この配列をEcoRI断片として、EcoRIで消化したpART7中にセンス方向でクローニングして中間体のpART7.PVYマルチを作成した。pART27.PVYマルチを作成するため、35Sプロモーター、PVY配列、及びOCSTerminalネーターをNotI断片として切り出し、NotIで消化したpART27中にクローニングした。適切な挿入方向をもつプラスミドを単離してpART27.PVYマルチと名付けた。

10

【0229】**実施例4****哺乳類におけるウイルス遺伝子の発現の不活性化**

ウイルスの免疫系統は安定に形質転換した細胞系統でウイルス配列を発現することにより生じる。

【0230】

特に、このアプローチには溶菌ウイルスが用いられる。その理由は、細胞の溶解は非常に単純な篩を提供し、且つウイルス免疫を生じうる極めてまれな形質転換事象を直接選択することを可能とするからである。単純な一本鎖RNAウイルス(ウシ・エンテロウイルス-BEV)又は複雑な二本鎖DNAウイルスのI型単純ヘルペスウイルス(HSV-I)に由来するサブゲノムの断片を適切なベクターにクローニングし、形質転換細胞中で発現させる。哺乳類の細胞系統は、強力なサイトメガロウイルス(CMV-IIE)プロモーターにより駆動されるウイルスの配列を発現するよう設計された遺伝子構築物を用いて形質転換される。用いられる配列には特異的なウイルス複製酵素の遺伝子が含まれる。典型的なウイルス遺伝子を含む無作為な「ショットガン」ライブラリー、及びウイルス配列の発現を標的化するように導入された分散した核酸分子も用いられる。

20

【0231】

BEVのRNA依存性RNAポリメラーゼ遺伝子に由来するヌクレオチド配列などの、この手法で使用される例示的な遺伝子構築物を本明細書で提示する。

【0232】

30

ウイルスのポリメラーゼ構築物のため、多数(約100)の形質転換した細胞系統を作成し、そして各ウイルスで感染させる。ショットガンライブラリーで形質転換した細胞に対して、非常に多数(数百)の形質転換系統が作成しそしてウイルス免疫について大規模にスクリーニングする。ウイルスを感染させた後、耐性のある細胞系統を選択し、そして免疫を付与する配列を決定するためにさらに分析する。

【0233】

耐性のある細胞系統は、哺乳類の系において導入されたヌクレオチド配列がウイルス遺伝子の発現を不活性化する能力があることを支持する。

【0234】

さらに、このような実験から得られる耐性系統は、観察される変化の分子的及び生化学的特性をより正確に規定するために使用される。

40

【0235】**実施例5****トランジェニック植物におけるウイルス耐性の導入**

アグロバクテリウム・ツメファシエンスのLBA4404株を、三親交雑(tri-parental matings)を用いて、構築物のpART27.PVY、pART27.PVY×2、pART27.PVY×3、pART27.PVY×4、pART27.PVY.LNYV.PVY、pART27.PVY.LNYV.YVP、pART27.35S.PVY.SCBV.O、pART27.35S.O.SCBV.PVY、pART27.35S.O.SCBV.YVP、pART27.35S

50

. P V Y . S C B V . Y V P 、 p A R T 2 7 . 3 5 S . P V Y x 3 . S C B V . Y V P x 3 、 p A R T 2 7 . P V Y x 3 . L N Y V . Y V P x 3 、 及び p A R T 2 7 . P V Y x 1 0 でそれぞれ形質転換した。これらの株から得られる D N A の微量調製物を調製し、 N o t I での制限を試験し、これらが適切な二元ベクターを含むことを確認した。

【 0 2 3 6 】

ニコチアナ・タバカム (W 3 8 品種) を、標準的手法を用いてこれらのアグロバクテリウム株で形質転換した。形質転換したと推定される苗条を切り出しカナマイシンを含有する培地上に根付させた。これらの条件の下で、本発明者らは、トランスジェニック苗条のみがカナマイシン平板上に根付くことを一貫して観察した。根付いた苗条は土壤に移し樹立させた。二から三週間後、少なくとも三枚の葉をもつ丈夫な植物を選択し、 P V Y に感染させた。

10

【 0 2 3 7 】

ウイルスの接種材料は、予めウイルスに感染させた W 3 8 タバコから調製した。すなわち、明白なウイルスの症状を示す約 2 g の葉材料を 1 0 0 m M の磷酸 N a 緩衝液 (p H 7 . 5) の 1 0 m l 中でカルバランダム (carbarundum) と共に粉砕した。この接種材料を追加の磷酸 N a 緩衝液で 2 0 0 m l まで希釈した。各トランスジェニック植物に由来する二枚の葉をカルバランダムと共に散布した後、 0 . 4 m l の接種材料を各葉にかけ、かなり激しく指で葉をこすった。この手法を用いて、非トランスジェニック対照植物の 1 0 0 % が P V Y に感染した。

【 0 2 3 8 】

20

ウイルス耐性及び免疫性を検定するため、トランスジェニック植物を症状の進行について監視する。 P V Y 株 (P V Y - D 、オーストラリアの P V Y 単離体) は W 3 8 タバコに明白な症状を与え、葉脈が透き通る症状は接種された葉の上方の二枚の葉に容易に観察され、それに続き葉は均一のクロロ障害を示す。症状の進行は 6 週間にわたって監視した。

【 0 2 3 9 】

ウイルスの症状の低減が示される場合、トランスジェニック株は耐性として記述した。そして、ウイルス症状の低減はクロロ障害を示す葉の減少として現れる。耐性は、植物でごく少数のウイルス病変しか観察されない非常に強い耐性から、植物成長の後期で見られる葉の症状の低減を示す弱い耐性までの範囲に及ぶ。

【 0 2 4 0 】

30

ウイルスの症状の証拠を全く示さないトランスジェニック植物は免疫体 (i m m u n e) として分類した。これらの植物が免疫体であることを確証するため、ウイルスを再接種したところ、ほとんどの植物が免疫体のままであり、症状を示した小数の植物は耐性として再分類した。

【 0 2 4 1 】

得られた植物系統についてサザン・プロットを行い、次世代の耐性を監視し、耐性 / 免疫が伝達できることを測定する。さらに、該系統を他の P V Y 株で感染させることによりウイルス耐性の範囲を観察し、宿主範囲の感受性が変化するかどうかを測定する。

【 0 2 4 2 】

40

これらの実験から得られた結果を表 2 に記載する。これらのデータは、標的遺伝子配列の縦列反復を、パリンドローム又は直列反復配列として分断されたパリンドロームのいずれかで含む構築物がトランスジェニック植物にウイルス耐性及び / 又は免疫を付与できることを示している。

【 0 2 4 3 】

従って、このような逆方向及び / 又は直列の反復配列はトランスジェニック植物でウイルスの標的遺伝子の発現を変化させる。

【 0 2 4 4 】

直列及び逆方向の反復配列の使用を組み合わせた構築物、即ち、 p A R T 2 7 . 3 5 S . P V Y x 3 . S C B V . Y V P x 3 と p A R T 2 7 . P V Y x 3 . L N Y V . Y V P x 3 も遺伝子発現を変化させるのに有用である。

50

【0245】**実施例6****動物細胞におけるGal tの不活性化**

Gal tの不活性化を検定するため、ブタのPK2細胞を関連のある構築物で形質転換した。PK2細胞は構成的にGal t酵素を発現し、Gal t酵素の活性により、これらの細胞の細胞表面上に発現するある範囲のタンパク質に種々の-1, 3-ガラクトシル基が付加される。細胞はリポフェクチンを用いて形質転換し、安定に形質転換した系統をゲネテシンを用いて選択した。

【0246】

最初の検定のように、Gal tをコードするエピトープ、即ち細胞表面タンパク質を修飾する-1, 3-ガラクトシル部分が存在するか否かについて、細胞系統をレクチンIB4を用いて探索した。IB4の結合はインサイチュ又はFACS選別のいずれかにより検定した。

10

【0247】

インサイチュ結合では、細胞を冷メタノールを用いて固体の支持体に5分間かけて固定し、細胞をPBS(磷酸緩衝生理食塩水)で洗浄し、非特異的なIB4の結合をPBS中1%BSAで10分間プロックした。固定した細胞を1%BSAのPBS中で室温で30分間かけて20μg/mlのIB4-ビオチン(シグマ社)を用いて探索し、次いで細胞をPBSで洗浄し、1:200のエキストラアビジン-FITC(シグマ社)PBS希釈液で30分間探索した後、さらにPBSで濯いだ。次に、PK2対照細胞の外表面が均一に緑色に染色される条件の下で、細胞を蛍光顕微鏡を用いて調べた。

20

【0248】

FACS分析では、細胞をトリプシン処理後懸濁し、HBSS/ヘペス(20mMのヘペスを添加したハンクの緩衝生理食塩水、pH7.4)で洗浄し、HBSS/ヘペス中で4で45分間かけて10μg/mlのIB4-ビオチン(シグマ社)で探索した。細胞をHBSS/ヘペスで洗浄し、1:200のエキストラアビジン-FITC(シグマ社)HBSS/ヘペス希釈液で4で45分間かけて探索し、FACS選別の前に冷HBSS/ヘペスで濯いだ。

【0249】

このアプローチを用いて、形質転換した細胞系統をGal tの不活性化について検定し、構築物の効率の定量的評価を求める。さらに、Gal tの不活性化を示す細胞系統を単離し、さらなる分子学的分析にかけ、遺伝子不活性化の機構を決定する。

30

【0250】**【表2】**

プラスミド構築物	試験された 植物の数	特定の表現型を示す 植物の百分率		
		感受性	免疫体	耐性
pART27.PVY	1 9	1 6	1	2
pART27.PVYx2	1 3	5	4	4
pART27.PVYx3	2 1	2	5	1 4
pART27.PVYx4	2 1	5	7	9
pART27.35S.PVY.SCBC.0	2 5	8	0	1 7
pART27.35S.O.SCBV.PVY	2 2	8	0	1 4
pART27.35S.O.SCBV.YVP	1 8	1 4	0	4
pART27.35S.PVY.SCBV.YVP	1 7	3	8	6
pART27.PVY.LNYV.PVY	2 6	1 8	2	6
pART27.PVY.LNYV.YVP	2 0	6	1 0	4
pART27.PVY.LNYV.YVP Δ	1 8	7	1 1	0

【0251】

参照文献

- 1 アン(An)ら、(1985)、EMBO J 4: 277-284。
- 2 アームストロング(Armstrong)ら、Plant Cell Report s 9: 335-339、1990。
- 3 オスベル(Ausubel)、エフ・エム・ら(1987)分子生物学の最新プロトコル、ヴィレー・インターライエンス(ISBN 047140338)。 40
- 4 チャルフィー(Chalfie)、エム・ら(1994)Science 263: 802-805。
- 5 クリストセン(Christensen)、エイ・エイチ・クエイル(Quail), ピー・エイチ・(1996)Transgenic Research 5: 213-218。
- 6 クリストウ(Christou)、ピー・ら、Plant Physiol 87: 671-674、1988。
- 【0253】
- 7 コルマック(Cormack)、ピー・ら(1996)Gene 173: 33-350

8。

8 クロスウェイ (Crossway) ら、Mol. Gen. Genet. 202: 17
9 - 185, 1986。

9 ドレル (Dorer), ディー.アール.とヘニコッフ (Henikoff), エス.
. (1994) Cell 7: 993 - 1002.

【0254】

10 フロム (Fromm) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82
2: 5824 - 5828, 1985.

11 グリーブ (Gleave), エイ.ピー. (1992) Plant Molecul
lar Biology 20: 1203 - 1207.

10

12 ハナハン (Hanahan), ディー. (1983) J. Mol. Biol. 166
6: 557 - 560.

【0255】

13 ヘレラ - エステラ (Herrera-Estrella) ら、Nature 303:
209 - 213, 1983a.

14 ヘレラ - エステラら、EMBO J. 2: 987 - 995, 1983b.

15 ヘレラ - エステラら、植物遺伝子工学、ケンブリッジ・ユニバーシティ・プレス
、ニューヨーク、63 ~ 93 頁、1985。

【0256】

16 イノウエ (Inouye), エス.とツジ (Tsujii), エフ.アイ. (199
4) FEBS Letts. 341: 277 - 280.

20

17 ジャクソン (Jackson), アイ.ジェイ. (1995) Ann. Rev. Genet. 28: 189 - 217.

18 クレンス (Krens), エフ.エイ. ら、Nature 296: 72 - 74,
1982.

【0257】

19 ウォン (Kwon), ビー.エス. ら (1988) Biochem. Biophys
s. Res. Comm. 153: 1301 - 1309.

20 パルーバハドラー (Pal-Bhadra), エム. ら (1997) Cell 90:
479 - 490.

30

21 パスズコヴスキ (Paszkowski) ら、EMBO J. 3: 2717 - 2
722, 1984.

【0258】

22 プラシエル (Prasher), ディー.シー. ら (1992) Gene 111:
229 - 233.

23 サンフォード (Sanford), ジェイ.シー. ら、Particulate
Science and Technology 5: 27 - 37, 1987.

【0259】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Benitec Australia Limited AND State of Queensland through its Department of Primary Industries

〈120〉 Control of gene expression

〈150〉 AU PP2492

〈151〉 1998-03-20

10

〈150〉 AU PP2499

〈151〉 1998-03-20

〈160〉 16

〈170〉 PatentIn version 3.0

〈210〉 1

〈211〉 26

〈212〉 DNA

〈213〉 jellyfish

20

〈400〉 1

agatctgtaa acggccacaa gttcag

26

〈210〉 2

〈211〉 26

〈212〉 DNA

⟨213⟩ jellyfish

⟨400⟩ 2

ggatccttgt acagctcgac catgcc

26

⟨210⟩ 3

⟨211⟩ 74

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ virus

10

⟨400⟩ 3

gtcgacaata aaatatctt atttcatta catctgtgtg ttggttttt gtgtgatttt

60

tgcggaaagcc tagg

74

⟨210⟩ 4

⟨211⟩ 31

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ virus

20

⟨400⟩ 4

gtcgacgttt agaggcagaag taacacttcc g

31

⟨210⟩ 5

⟨211⟩ 38

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ virus

⟨400⟩ 5
cggcagatct aacaatggca ggacaaatcg agtacatc 38

⟨210⟩ 6
⟨211⟩ 31
⟨212⟩ DNA
⟨213⟩ virus 10

⟨400⟩ 6
cccgggatcc tcgaaagaat cgtaccactt c 31

⟨210⟩ 7
⟨211⟩ 29
⟨212⟩ DNA
⟨213⟩ virus

⟨400⟩ 7
gggcggatcc tttagaaagaa tcgtaccac 29 20

⟨210⟩ 8
⟨211⟩ 28
⟨212⟩ DNA
⟨213⟩ virus

⟨400⟩ 8

cggcagatct ggacaaaatcg agtacatc	28	
⟨210⟩ 9		
⟨211⟩ 37		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ agrobacterium		
⟨400⟩ 9		
ggattcccg gacgtcgca attcccccg atcgttc	37	10
⟨210⟩ 10		
⟨211⟩ 33		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ agrobacterium		
⟨400⟩ 10		
ccatggccat ataggccgaa tcttagtaaca tag	33	
		20
⟨210⟩ 11		
⟨211⟩ 33		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ virus		
⟨400⟩ 11		
ccatggccta tatggccatt ccccacattc aag	33	

〈210〉 12		
〈211〉 27		
〈212〉 DNA		
〈213〉 virus		
 〈400〉 12		
aacgttaact tctacccagt tccagag	27	
		10
〈210〉 13		
〈211〉 27		
〈212〉 DNA		
〈213〉 virus		
 〈400〉 13		
atgggatccg ttatgccaaag aagaagga	27	
		20
〈210〉 14		
〈211〉 24		
〈212〉 DNA		
〈213〉 virus		
 〈400〉 14		
tgtggatccc taacggaccc gatg	24	
		30
〈210〉 15		
〈211〉 72		
〈212〉 DNA		
〈213〉 virus		
 〈400〉 15		
taatgaggat gatgtcccta cctttaattt gcagaaattt ctgtggaaag acagggaaat	60	
ctttcggcat tt	72	
		40
〈210〉 16		
〈211〉 72		
〈212〉 DNA		
〈213〉 virus		
 〈400〉 16		
ttctgccaat taaaggtagg gacatcatcc tcattaaaat gccgaaagat ttccctgtct	60	
ttccacagaa at	72	

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はプラスミドpEGFP-N1 MCSの図式的表示である。

【図2】 図2はプラスミドpCMV.cassの図式的表示である。

- 【図3】 図3はプラスミドpCMV.SV40L.cassの図式的表示である。
- 【図4】 図4はプラスミドpCMV.SV40LR.cassの図式的表示である。
- 【図5】 図5はプラスミドpCR.Bgl-GFP-Bamの図式的表示である。
- 【図6】 図6はプラスミドpBSII(SK+).EGFPの図式的表示である。
- 【図7】 図7はプラスミドpCMV.EGFPの図式的表示である。
- 【図8】 図8はプラスミドpCR.SV40Lの図式的表示である。
- 【図9】 図9はプラスミドpCR.BEV.1の図式的表示である。
- 【図10】 図10はプラスミドpCR.BEV.2の図式的表示である。
- 【図11】 図11はプラスミドpCR.BEV.3の図式的表示である。
- 【図12】 図12はプラスミドpCMV.EGFP.BEV2の図式的表示である。 10
- 【図13】 図13はプラスミドpCMV.BEV2の図式的表示である。
- 【図14】 図14はプラスミドpCMV.BEV3の図式的表示である。
- 【図15】 図15はプラスミドpCMV.VEBの図式的表示である。
- 【図16】 図16はプラスミドpCMV.BEV.GFPの図式的表示である。
- 【図17】 図17はプラスミドpCMV.BEV.SV40L-Oの図式的表示である
。
【図18】 図18はプラスミドpCMV.O.SV40L.BEVの図式的表示である
。
【図19】 図19はプラスミドpCMV.O.SV40L.VEBの図式的表示である
。
【図20】 図20はプラスミドpCMV.BEVx2の図式的表示である。 20
- 【図21】 図21はプラスミドpCMV.BEVx3の図式的表示である。
- 【図22】 図22はプラスミドpCMV.BEVx4の図式的表示である。
- 【図23】 図23はプラスミドpCMV.BEV.SV40L.BEVの図式的表示である。
- 【図24】 図24はプラスミドpCMV.BEV.SV40L.VEBの図式的表示である。
- 【図25】 図25はプラスミドpCMV.BEV.GFP.VEBの図式的表示である
。
【図26】 図26はプラスミドpCMV.EGFP.BEV2.PFGの図式的表示である。 30
- 【図27】 図27はプラスミドpCMV.BEV.SV40LRの図式的表示である。
- 【図28】 図28はプラスミドpCDNA3.Gal tの図式的表示である。
- 【図29】 図29はプラスミドpCMV.Gal tの図式的表示である。
- 【図30】 図30はプラスミドpCMV.EGFP.Gal tの図式的表示である。
- 【図31】 図31はプラスミドpCMV.Gal t.GFPの図式的表示である。
- 【図32】 図32はプラスミドpCMV.Gal t.SV40L.Oの図式的表示である。
- 【図33】 図33はプラスミドpCMV.Gal t.SV40L.tlaGの図式的表示である。 40
- 【図34】 図34はプラスミドpCMV.O.SV40L.Gal tの図式的表示である。
- 【図35】 図35はプラスミドpCMV.Gal t x 2の図式的表示である。
- 【図36】 図36はプラスミドpCMV.Gal t x 4の図式的表示である。
- 【図37】 図37はプラスミドpCMV.Gal t.SV40L.Gal tの図式的表示である。
- 【図38】 図38はプラスミドpCMV.Gal t.SV40L.tlaGの図式的表示である。
- 【図39】 図39はプラスミドpCMV.Gal t.GFP.tlaGの図式的表示である。 50

【図40】 図40はプラスミドpCMV.EGFP.Galt.PFGの図式的表示である。

【図41】 図41はプラスミドpCMV.Galt.SV40LRの図式的表示である。

【図42】 図42はプラスミドpART7の図式的表示である。

【図43】 図43はプラスミドpART7.35S.SCBV.cassの図式的表示である。

【図44】 図44はプラスミドpBC.PVYの図式的表示である。

【図45】 図45はプラスミドpSP72.PVYの図式的表示である。

【図46】 図46はプラスミドpCapBC.PVYの図式的表示である。 10

【図47】 図47はプラスミドpBC.PVY×2の図式的表示である。

【図48】 図48はプラスミドpSP72.PVY×2の図式的表示である。

【図49】 図49はプラスミドpBC.PVY×3の図式的表示である。

【図50】 図50はプラスミドpBC.PVY×4の図式的表示である。

【図51】 図51はプラスミドpBC.PVY.LNYVの図式的表示である。

【図52】 図52はプラスミドpBC.PVY.LNYV.PVYの図式的表示である。

【図53】 図53はプラスミドpBC.PVY.LNYV.YVPの図式的表示である。

【図54】 図54はプラスミドpBC.PVY.LNYV.YVPの図式的表示である。 20

【図55】 図55はプラスミドpART27.PVYの図式的表示である。

【図56】 図56はプラスミドpART27.35S.PVY.SC BV.Oの図式的表示である。

【図57】 図57はプラスミドpART27.35S.O.SC BV.PVYの図式的表示である。

【図58】 図58はプラスミドpART27.35S.O.SC BV.YVPの図式的表示である。

【図59】 図59はプラスミドpART7.PVY×2の図式的表示である。

【図60】 図60はプラスミドpART7.PVY×3の図式的表示である。 30

【図61】 図61はプラスミドpART7.PVY×4の図式的表示である。

【図62】 図62はプラスミドpART7.PVY.LNYV.PVYの図式的表示である。

【図63】 図63はプラスミドpART7.PVY.LNYV.YVPの図式的表示である。

【図64】 図64はプラスミドpART7.PVY.LNYV.YVPの図式的表示である。

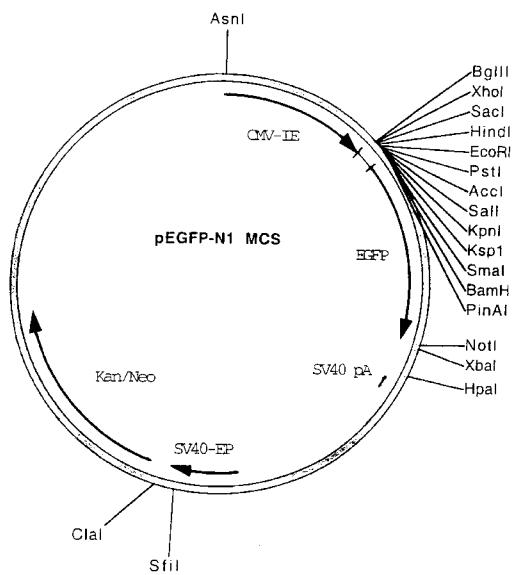
【図65】 図65はプラスミドpART7.35S.PVY.SC BV.YVPの図式的表示である。

【図66】 図66はプラスミドpART7.35S.PVY×3.SC BV.YVP×3の図式的表示である。 40

【図67】 図67はプラスミドpART7.PVY×3.LNYV.YVP×3の図式的表示である。

【図68】 図68はプラスミドpART7.PVYマルチの図式的表示である。

【図1】



【図2】

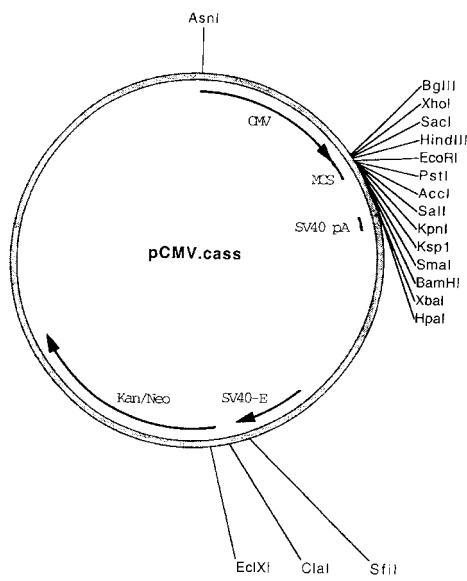
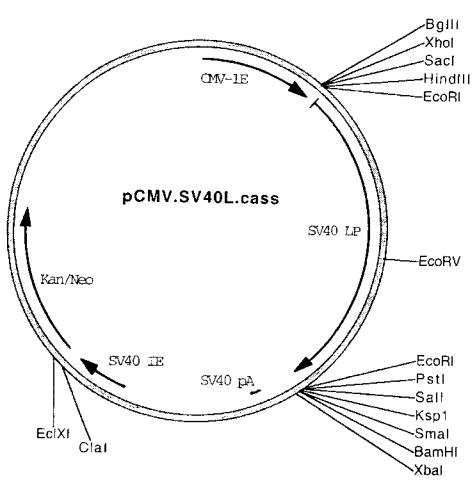


FIGURE 2

FIGURE 1

【図3】



【図4】

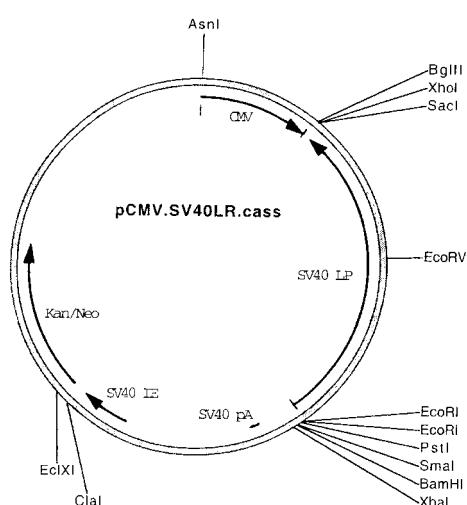


FIGURE 3

FIGURE 4

【図5】

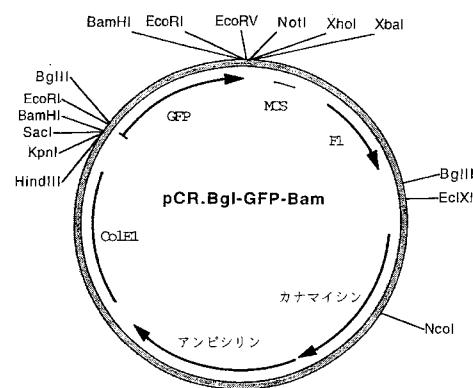


FIGURE 5

【図6】

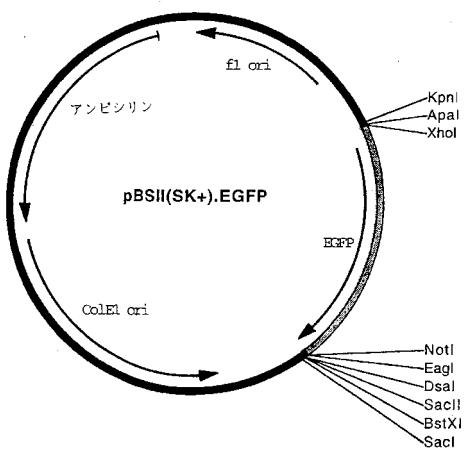


FIGURE 6

【図7】

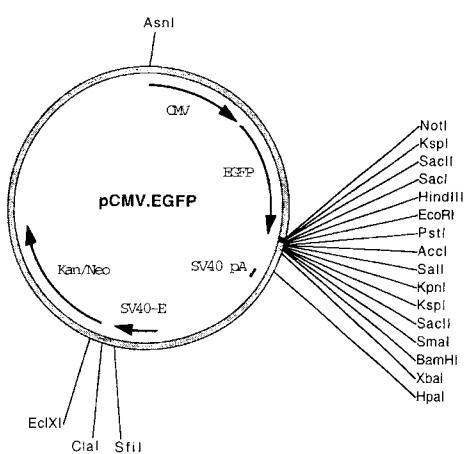


FIGURE 7

【図8】

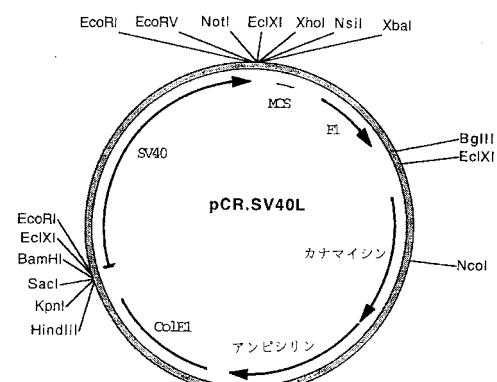
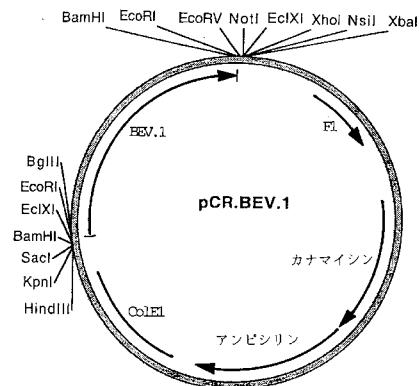


FIGURE 8

【図9】



【図10】

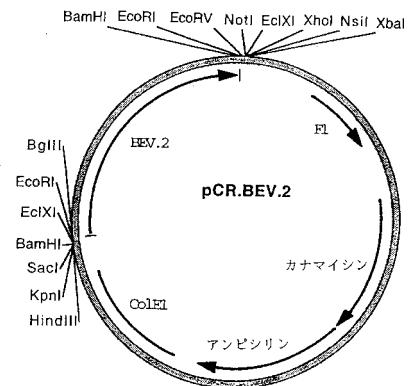
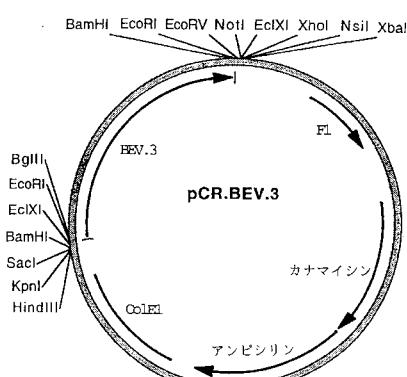


FIGURE 9

FIGURE 10

【図11】



【図12】

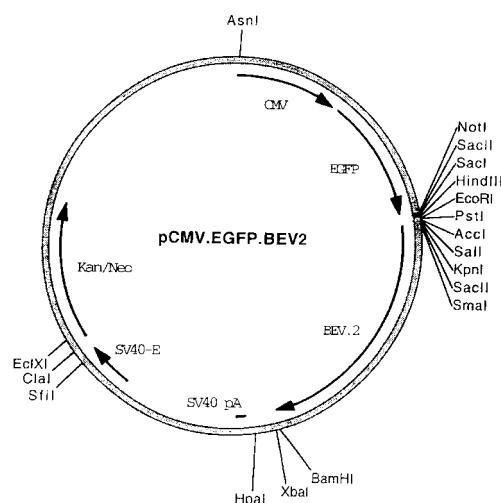


FIGURE 11

FIGURE 12

【図13】

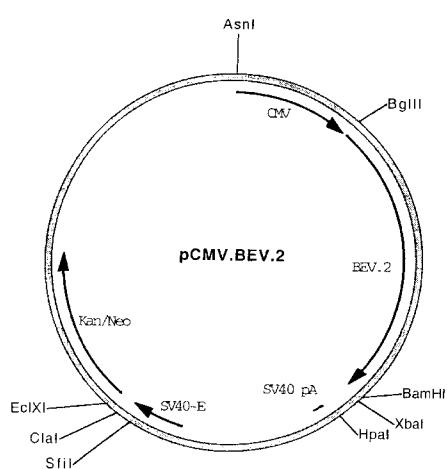


FIGURE 13

【図14】

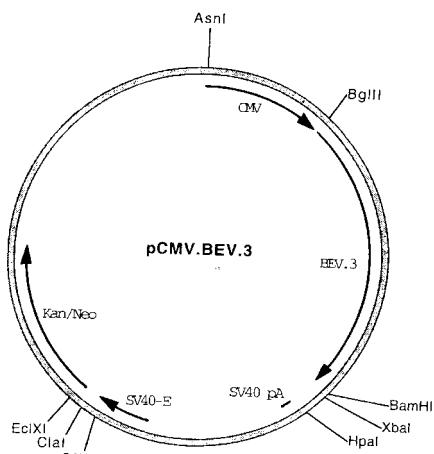


FIGURE 14

【図15】

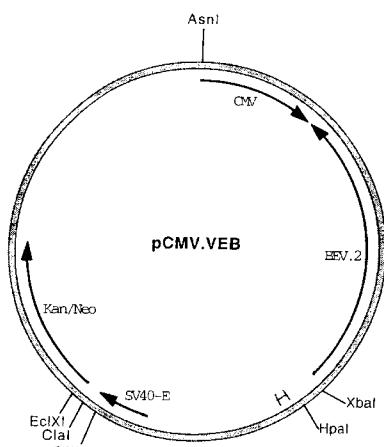


FIGURE 15

【図16】

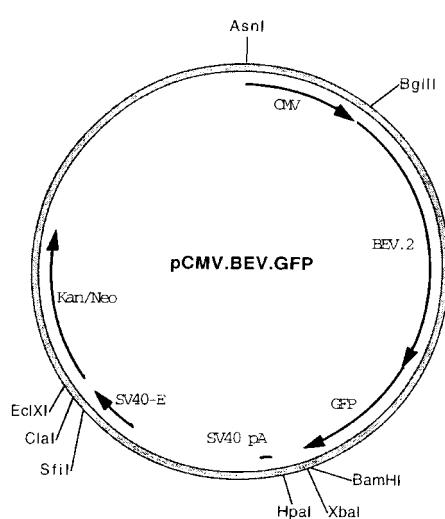


FIGURE 16

【図17】

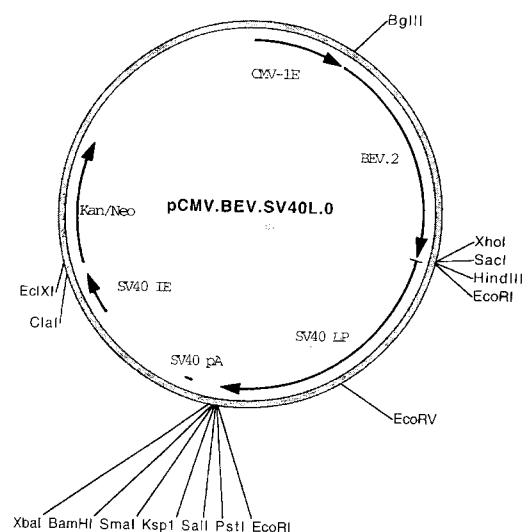


FIGURE 17

【図18】

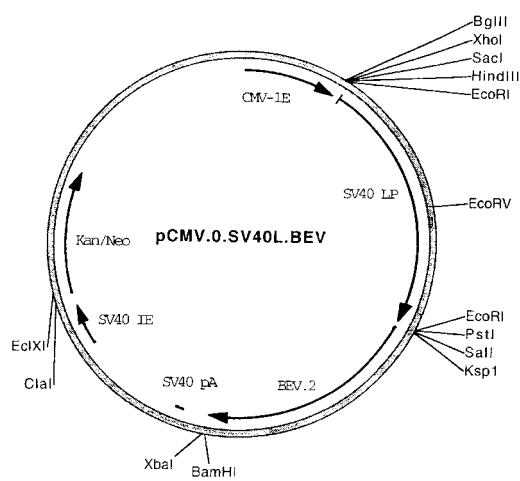


FIGURE 18

【図19】

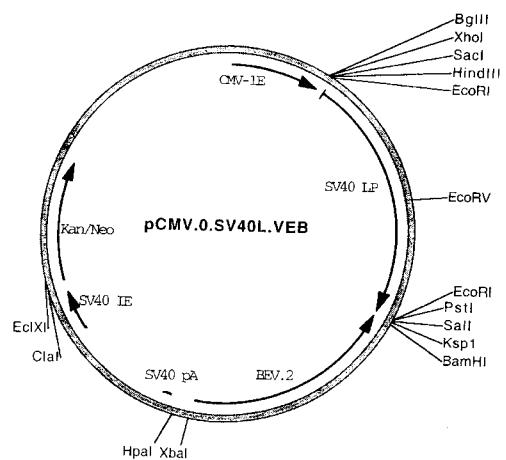


FIGURE 19

【図20】

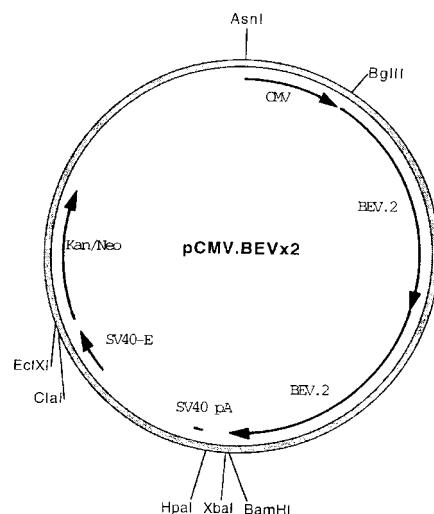
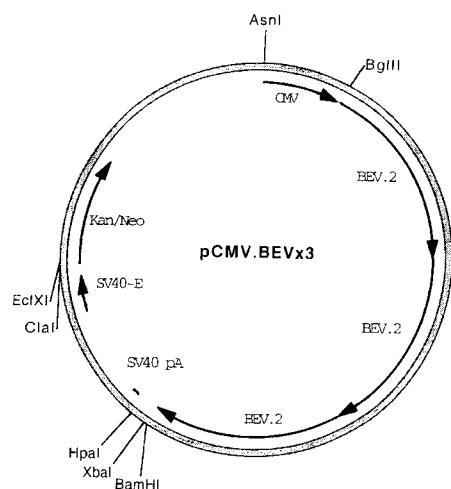


FIGURE 20

【図21】



【図22】

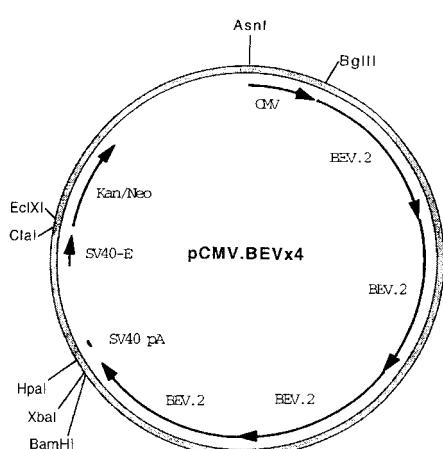
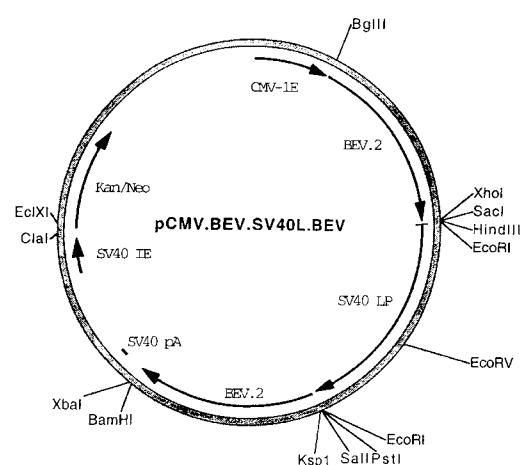


FIGURE 21

FIGURE 22

【図23】



【図24】

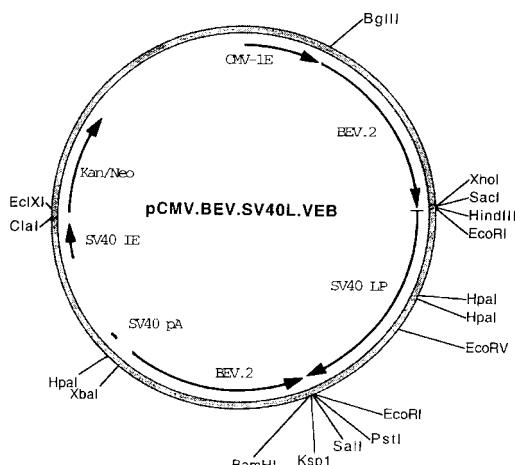


FIGURE 23

FIGURE 24

【図25】

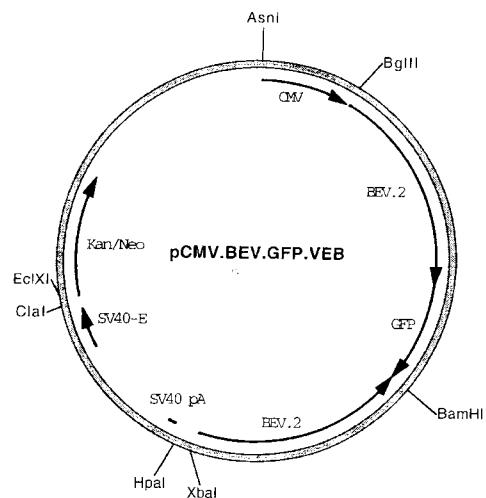


FIGURE 25

【図26】

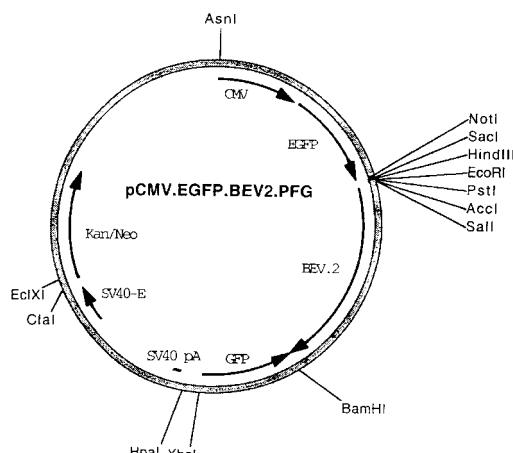


FIGURE 26

【図27】

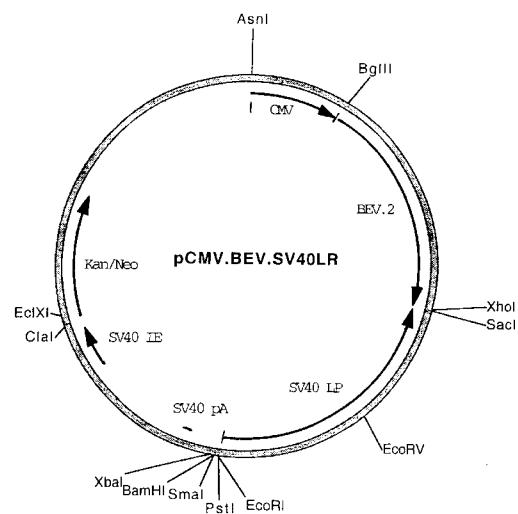


FIGURE 27

【図28】

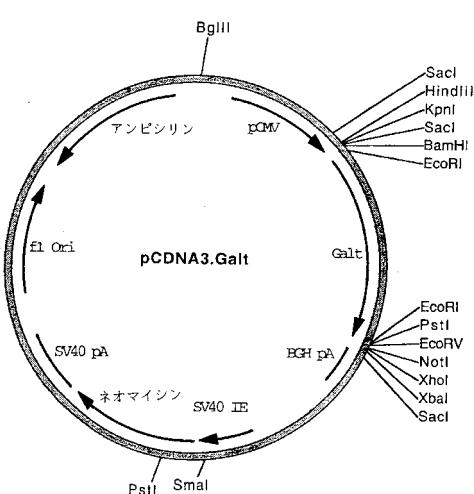
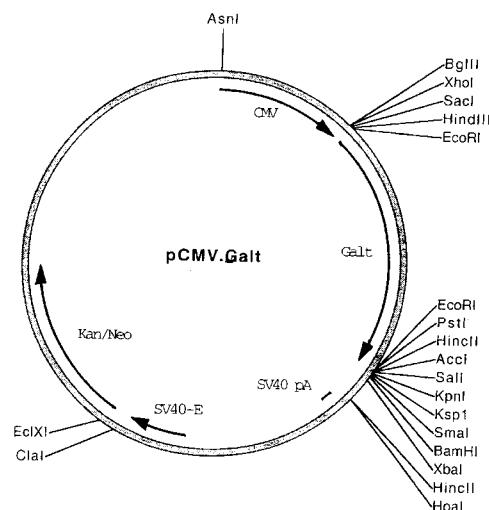


FIGURE 28

【図29】



【図30】

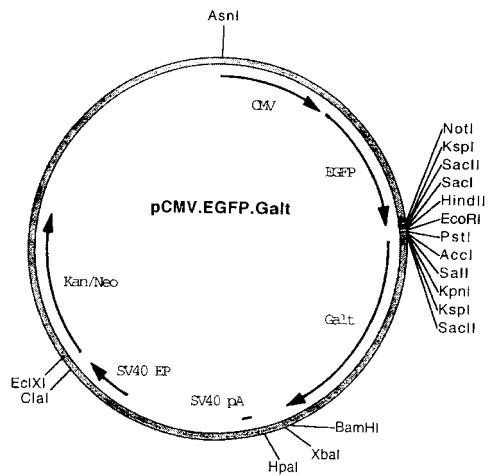
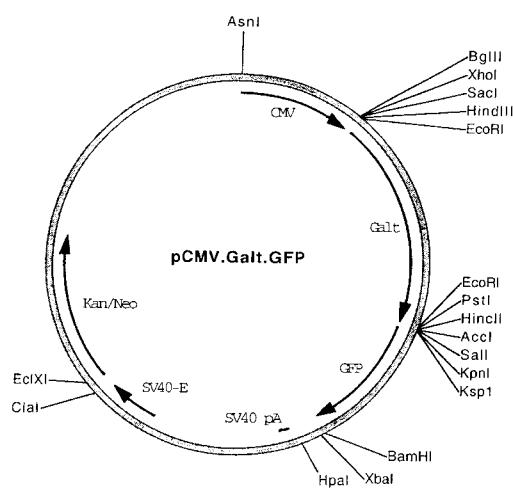


FIGURE 30

FIGURE 29

【図31】



【図32】

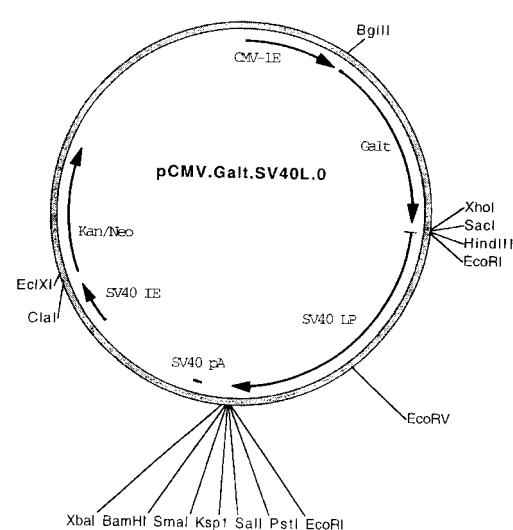
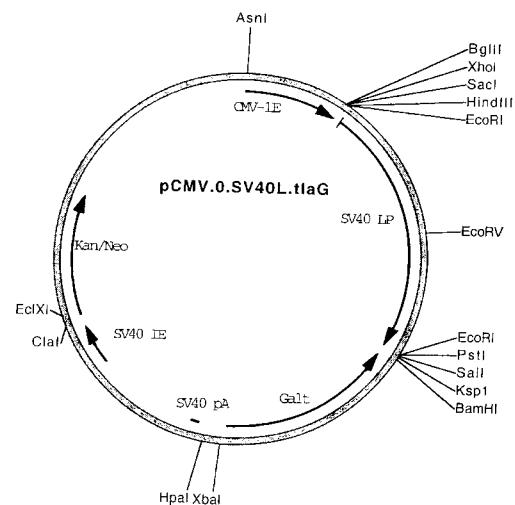


FIGURE 32

FIGURE 31

【図33】



【図34】

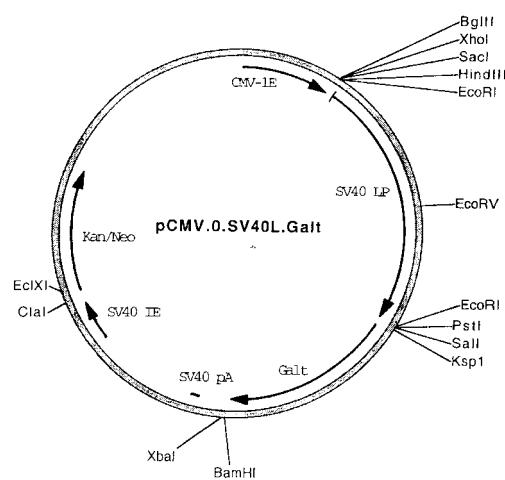
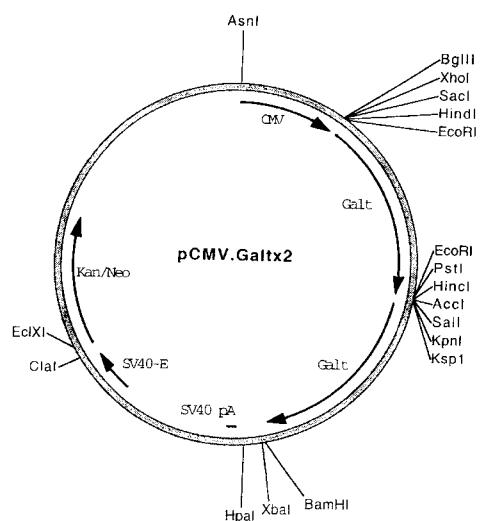


FIGURE 33

FIGURE 34

【図35】



【図36】

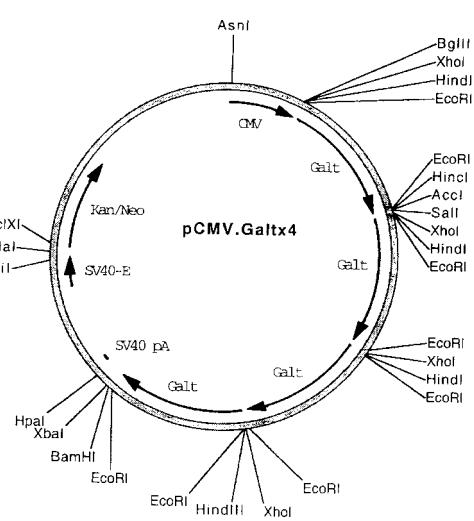
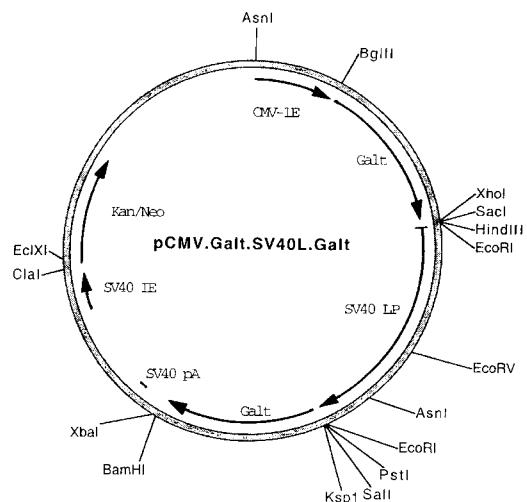


FIGURE 35

FIGURE 36

【図37】



【図38】

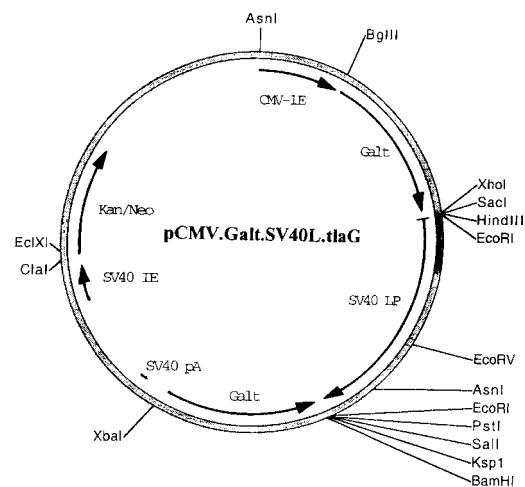
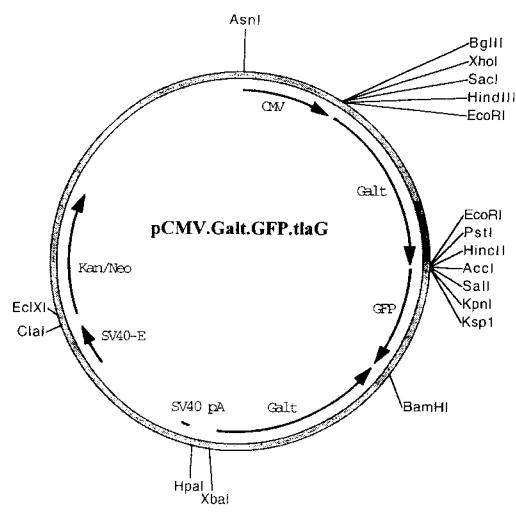


FIGURE 37

FIGURE 38

【図39】



【図40】

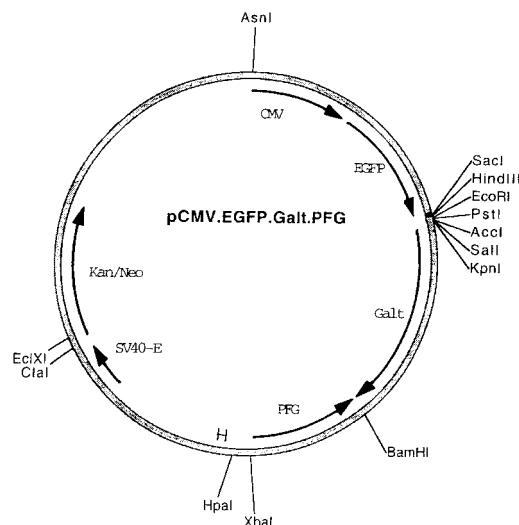
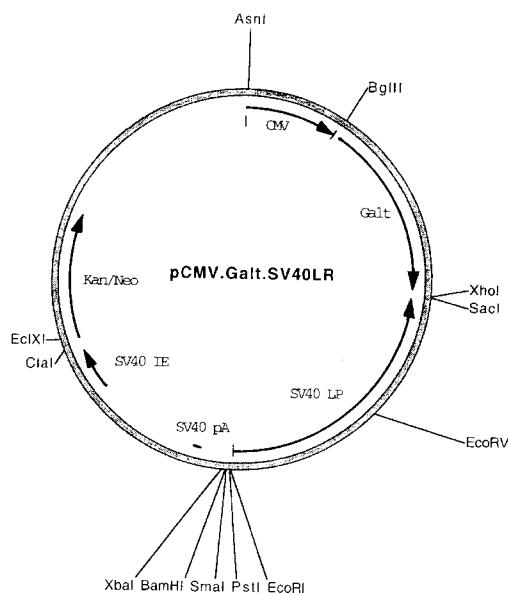


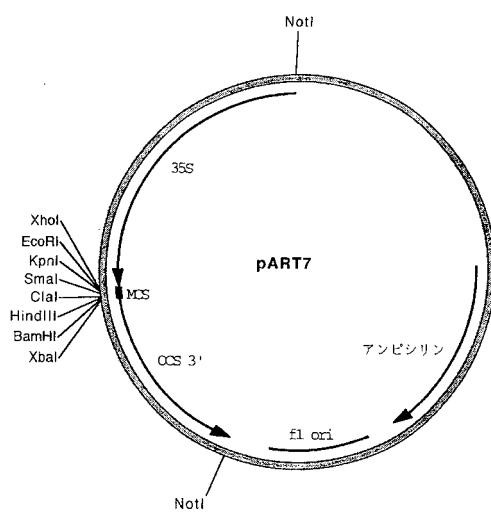
FIGURE 39

FIGURE 40

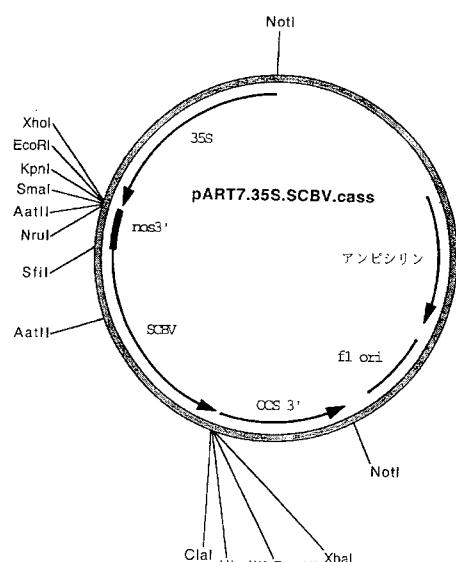
【図41】



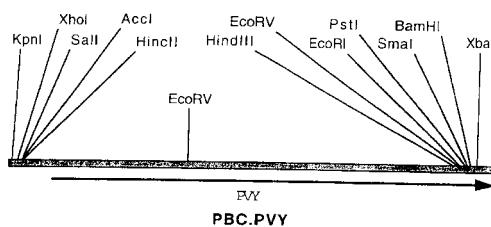
【図42】

**FIGURE 42****FIGURE 41**

【図43】



【図44】

**FIGURE 44****FIGURE 43**

【図45】

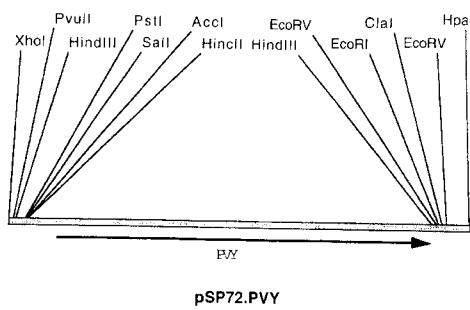


FIGURE 45

【図46】

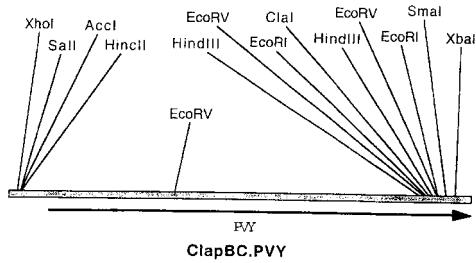


FIGURE 46

【図47】

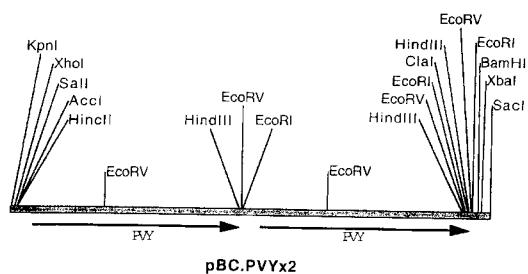


FIGURE 47

【図48】

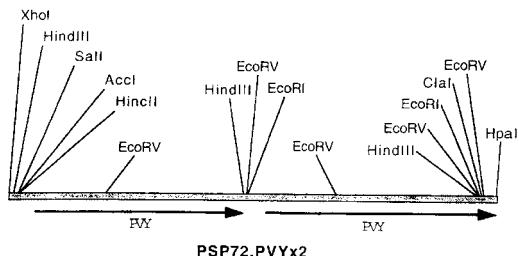
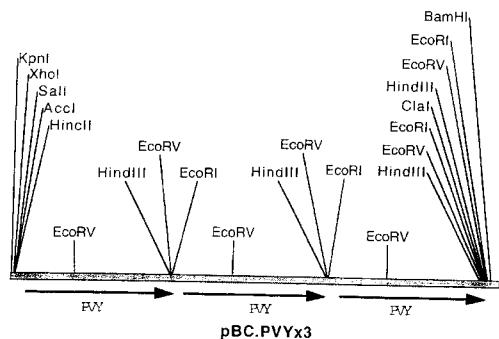


FIGURE 48

【図49】



【図50】

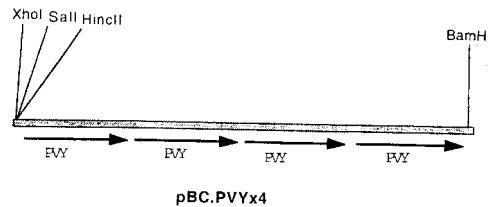
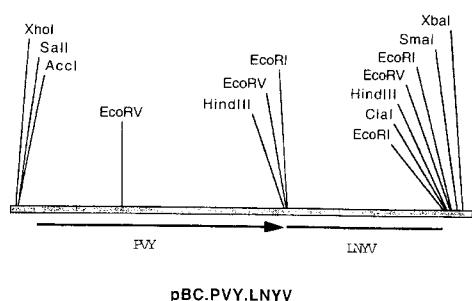


FIGURE 50

FIGURE 49

【図51】



【図52】

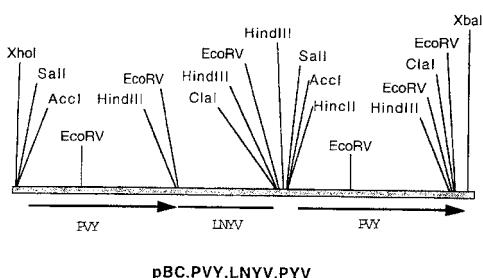


FIGURE 51

FIGURE 52

【図 5 3】

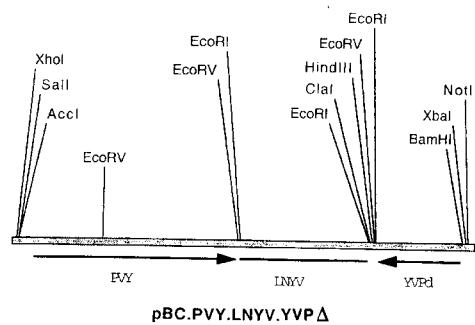


FIGURE 53

【図 5 4】

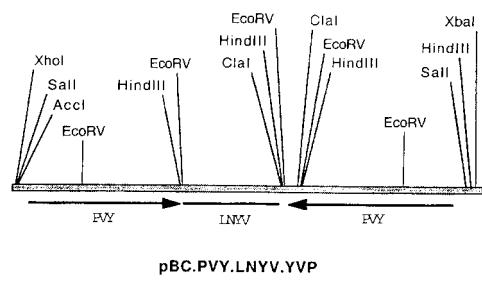


FIGURE 54

【図 5 5】

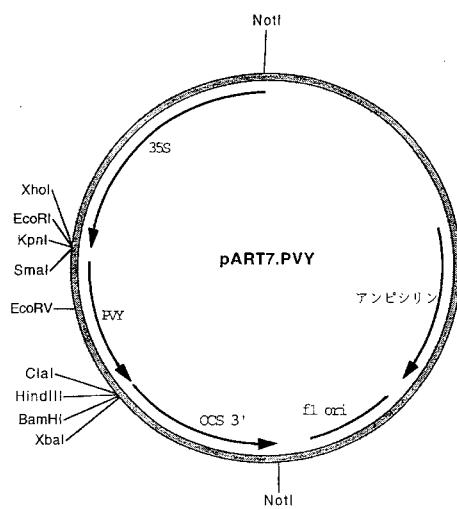


FIGURE 55

【図 5 6】

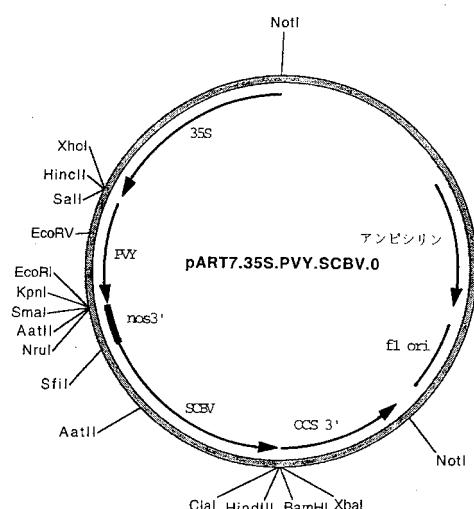
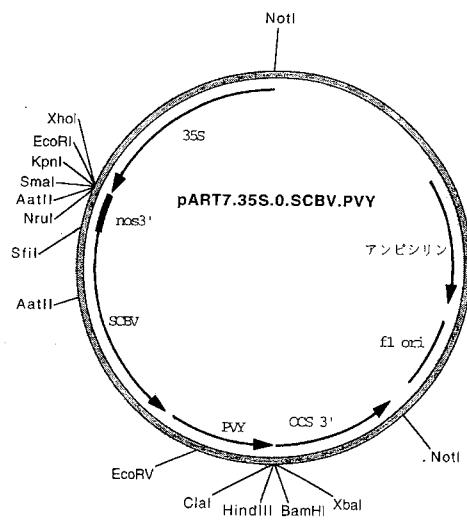


FIGURE 56

【図57】



【図58】

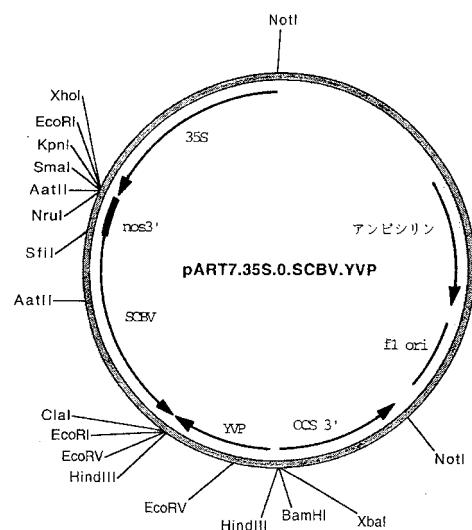
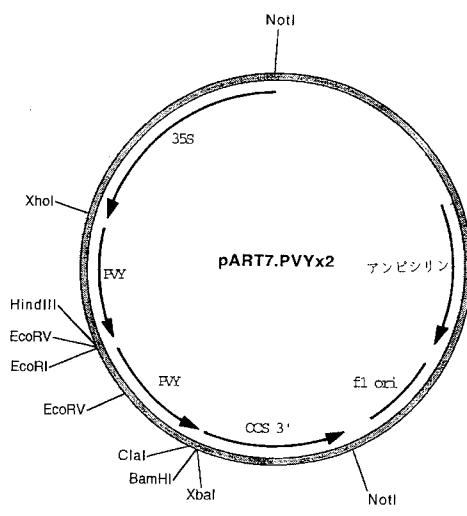


FIGURE 57

FIGURE 58

【図59】



【図60】

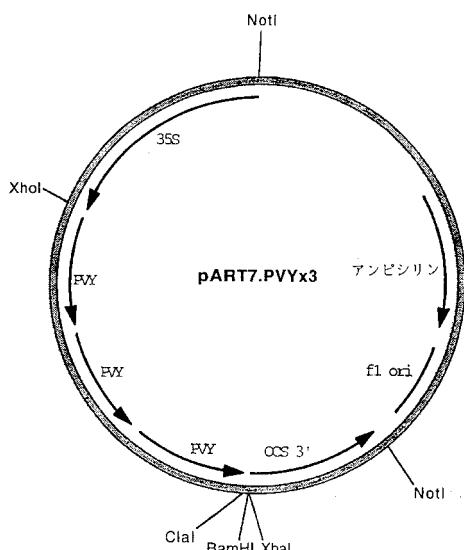
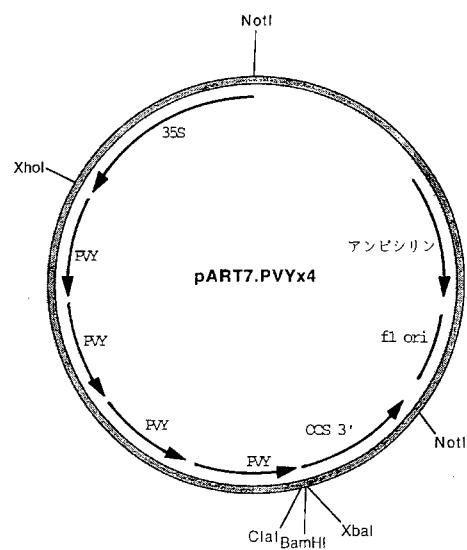


FIGURE 59

FIGURE 60

【図 6 1】



【図 6 2】

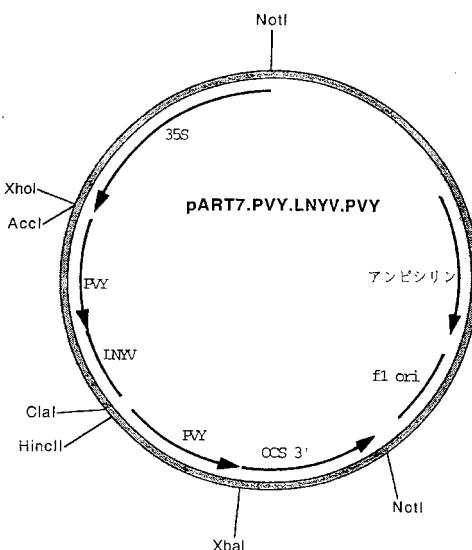
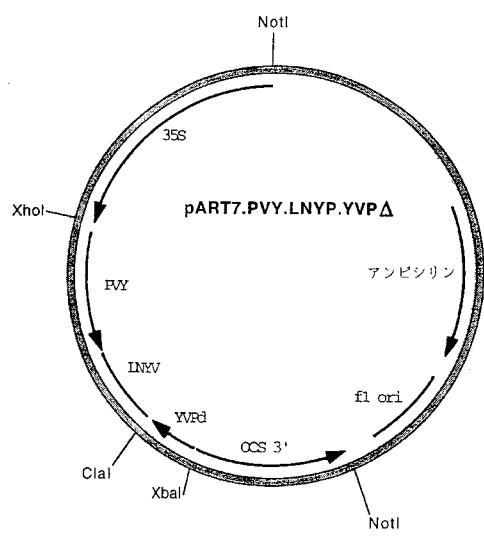


FIGURE 61

FIGURE 62

【図 6 3】



【図 6 4】

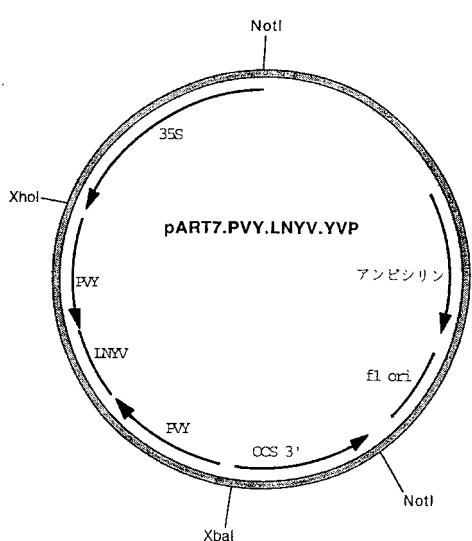


FIGURE 63

FIGURE 64

【図 6 5】

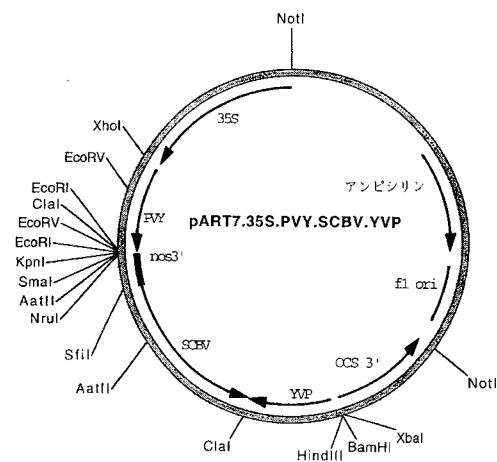


FIGURE 65

【図 6 6】

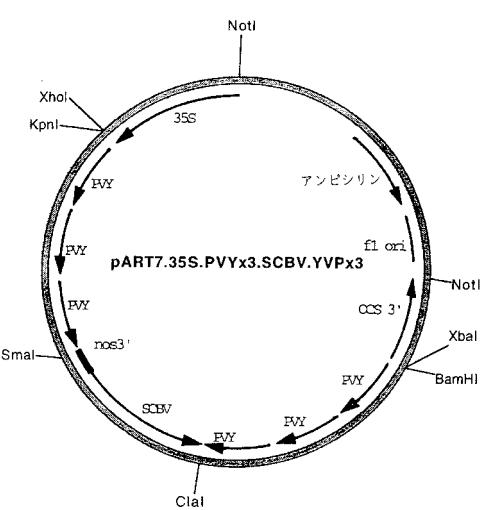


FIGURE 66

【図 6 7】

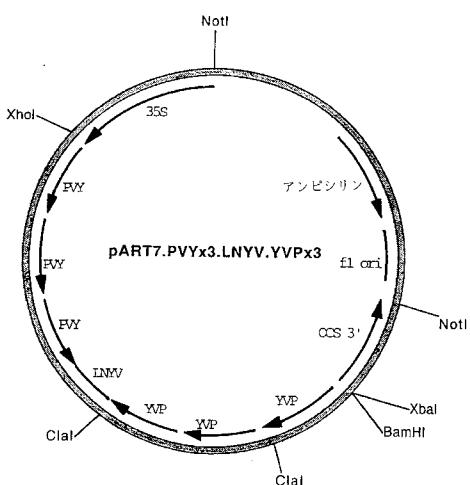


FIGURE 67

【図 6 8】

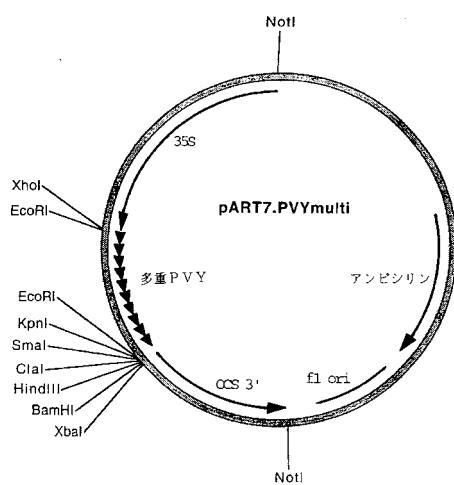


FIGURE 68

フロントページの続き

(74)代理人 100114007
弁理士 平山 孝二

(72)発明者 マイケル ウエイン グラハム
オーストラリア国、クイーンズランド 4076、セント ルシア、ラグラン ストリート 42
番地

(72)発明者 ロバート ノーマン ライス
オーストラリア国、クイーンズランド 4073、シナモン パーク、フォーリー ブレース 3
9番地

(72)発明者 ピーター マイケル ウォーターハウス
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2602 オコーナー バンジ
ン ストリート 5

(72)発明者 ミン ボー ワン
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2617 カリーン キーワ
ストリート 3

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 Cell, 米国, 1994年, Vol.77, 993-1002
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 米国, 1995年 2月28日, Vol.92, No.5, 1679-1683
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 米国, 1996年10月 1日, Vol.93, No.20, 10881-10886

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
A01H 1/00
C12N 5/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS(STN)
PubMed