

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6073247号
(P6073247)

(45) 発行日 平成29年2月1日 (2017.2.1)

(24) 登録日 平成29年1月13日 (2017.1.13)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 C
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 24 (全 55 頁)

(21) 出願番号	特願2013-549791 (P2013-549791)	(73) 特許権者	596060424
(86) (22) 出願日	平成24年1月17日 (2012.1.17)		フィリップ・モーリス・プロダクツ・ソシ
(65) 公表番号	特表2014-506136 (P2014-506136A)		エテ・アノニム
(43) 公表日	平成26年3月13日 (2014.3.13)		スイス国セアシュール 2000 ヌシャテル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/050630		、ケ、ジャンルノー 3
(87) 国際公開番号	W02012/098111	(74) 代理人	100092093
(87) 国際公開日	平成24年7月26日 (2012.7.26)		弁理士 辻居 幸一
審査請求日	平成27年1月16日 (2015.1.16)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	11151187.9		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成23年1月17日 (2011.1.17)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100119013
			弁理士 山崎 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物で核酸を発現させるベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1に記載のポリヌクレオチド配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるポリヌクレオチド配列を有し、以下の核酸エレメントを含むベクター分子であって、当該核酸エレメントが、環状ポリヌクレオチド分子上で提供され、さらに複製、維持又は核酸移転において機能をもたないギャップヌクレオチド配列によって分離されており、前記ギャップヌクレオチド配列が総計ベクターサイズの20%未満を占め、核酸エレメント (a) から (e) は、配列番号：1に提供される対応エレメントと同じ機能性を示す、前記ベクター分子：

- (a) 大腸菌 (*Escherichia coli*) 及びアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 種で機能する選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む第一の核酸エレメント；
- (b) 大腸菌で機能する第一の複製起点のヌクレオチド配列を含む第二の核酸エレメント；
- (c) 複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第三の核酸エレメント；
- (d) 第一の複製起点と異なり、さらにアグロバクテリウムで機能する、第二の複製起点のヌクレオチド配列を含む第四の核酸エレメント；及び
- (e) 腫瘍誘導アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) プラスミド又はアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) の根誘導プラスミドのT-DNA右境界配列及びT-DNA左境界配列を含むT-DNA領域のヌクレオチド配列を含む第五の核酸エレメント。

10

20

【請求項 2】

核酸エレメント (a) から (e) が、請求項1に示す順序でベクター分子上に配置される、請求項1に記載のベクター分子。

【請求項 3】

請求項1又は2に記載のベクター分子であって、

(a) T-DNA左境界配列及び選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列 (a) が300bpを超えない第一のギャップヌクレオチド配列によって分離され；

(b) 選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列 (a) 及び第一の複製起点のヌクレオチド配列 (b) が200bpを超えない第二のギャップヌクレオチド配列によって分離され；

(c) 第一の複製起点のヌクレオチド配列 (b) 及び複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列 (c) が200bpを超えない第三のギャップヌクレオチド配列によって分離され；

(d) 複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列 (c) 及び第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) が500bpを超えない第四のギャップヌクレオチド配列によって分離され；さらに

(e) 第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) 及びT-DNA右境界配列が150bpを超えない第五のギャップヌクレオチド配列によって分離される、前記ベクター分子。

【請求項 4】

第一の核酸エレメント (a) が抗生物質耐性をコードするヌクレオチド配列を含み、前記抗生物質が、アンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン、テトラサイクリン、ゲンタマイシン、スペクチノマイシン、ブレオマイシン、フレオマイシン、リファンピシン、ストレプトマイシン及びブラスチジジンSから成る群から選択される、請求項1から3のいずれか1項に記載のベクター分子。

【請求項 5】

第二の核酸エレメント (b) が、ColE1複製起点又は不和合性グループFI、FII、FIII、FIV、I、J、N、O、P、Q、T若しくはWのいずれかに属する複製起点から成る群から選択される第一の複製起点のヌクレオチド配列を含む、請求項1から4のいずれか1項に記載のベクター分子。

【請求項 6】

第四の核酸エレメント (d) が、最小oriV複製起点である第二の複製起点のヌクレオチド配列を含む、請求項1から5のいずれか1項に記載のベクター分子。

【請求項 7】

第五の核酸エレメント (e) が少なくとも1つの固有の制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む、請求項1から6のいずれか1項に記載のベクター分子。

【請求項 8】

第五の核酸エレメントがさらに、T-DNA右境界配列とT-DNA左境界配列との間に、植物細胞で機能を有する調節性エレメントを含む、請求項1から7のいずれか1項に記載のベクター分子。

【請求項 9】

第五の核酸エレメントがさらに、T-DNA右境界配列とT-DNA左境界配列との間に、植物細胞で機能を有する調節性エレメントに作動できるように連結された対象タンパク質のコードヌクレオチド配列を含む、請求項1から8のいずれか1項に記載のベクター分子。

【請求項 10】

対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、成長因子、レセプター、リガンド、シグナリング分子、キナーゼ、酵素、ホルモン、腫瘍サプレッサー、血液凝固タンパク質、細胞周期タンパク質、代謝タンパク質、神経タンパク質、心臓タンパク質、特定の症状で不足するタンパク質、抗体又はそのフラグメント、抗原、感染症に対する耐性を提供するタンパク質、抗菌性タンパク質、インターフェロン及びサイトカインから成る群から選択される、請求項9に記載のベクター分子。

【請求項 11】

対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列が遺伝子サイレンシングのサプレッサーである、請求項9に記載のベクター分子。

【請求項12】

対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、配列番号：24に示されるインフルエンザヘマグルチニン5（H5）である、請求項9又は10に記載のベクター分子。

【請求項13】

対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、抗体の軽鎖、抗体の重鎖、抗体の軽鎖及び重鎖の両方をコードするヌクレオチド配列であって、前記重鎖又は軽鎖が、リツキシマブの抗体結合部位を有する、ヒトCD20と結合する抗体の重鎖又は軽鎖である、請求項9又は10に記載のベクター分子。

10

【請求項14】

前記ヌクレオチド配列がヒトCD20と結合する免疫グロブリンの成熟重鎖をコードし、さらに配列番号：32と少なくとも90%、92%、94%、96%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を示す、請求項13に記載のベクター分子。

【請求項15】

前記ヌクレオチド配列がヒトCD20と結合する免疫グロブリンの成熟軽鎖をコードし、さらに配列番号：35と少なくとも90%、92%、94%、96%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を示す、請求項13に記載のベクター分子。

【請求項16】

対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、植物細胞での発現のために最適化されてある配列を含む、請求項9から15のいずれか1項に記載のベクター分子。

20

【請求項17】

対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列中の1つ以上のコドンが植物の優先コドンで置き換えられてある、請求項16に記載のベクター分子。

【請求項18】

対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、ミラビリスモザイクウイルス由来の強化FLtプロモーター（pMMV2x）と作動できるように連結される、請求項9から17のいずれか1項に記載のベクター分子。

【請求項19】

以下の工程を含む、植物で異種ポリペプチドを製造する方法：

30

（i）選択した品種、育種系統又は栽培品種及び請求項9から18のいずれか1項に記載のベクターを含む選択したアグロバクテリウム株の組合せを提供する工程；

（ii）前記選択品種、育種系統又は栽培品種の全植物に前記選択アグロバクテリウム株の細菌懸濁物を浸潤させる工程；

（iii）浸潤植物中の発現性ヌクレオチド配列の発現及び対象タンパク質の蓄積を可能にする条件下で、前記浸潤植物を5から10日間インキュベートする工程。

【請求項20】

植物がニコチアナ・タバクムの植物である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

請求項9から18のいずれか1項に記載のベクターの少なくとも1つを植物細胞に導入する工程、及び植物細胞をインキュベートして対象タンパク質を産生させる工程を含む、植物細胞で対象タンパク質を製造する方法。

40

【請求項22】

請求項1-18のいずれか1項に記載のベクター分子を含む植物細胞。

【請求項23】

第五の核酸エレメントがさらに、T-DNA右境界配列とT-DNA左境界配列との間に、植物細胞で機能を有する調節性エレメントと作動できるように連結された請求項9から18のいずれか1項の対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項22に記載の植物細胞。

【請求項24】

50

対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項23に記載の植物細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物での核酸発現のためのベクター及びそれらの利用に関する。特に、本発明のベクターは、ニコチアナ (Nicotiana) 属に由来する植物の細胞で核酸を安定的及び一過性に発現させるために有用である。

【背景技術】

【0002】

植物細胞での過剰発現、サイレンシング及びノックアウトは、多様な植物の組織における遺伝子の発現又は細胞内分布を研究するための強力なツールである。植物細胞での外因性核酸の調節的発現もまた、選択植物器官（例えば根、葉、茎、種子又はトリコーム）である種の代謝物又はタンパク質を生成する目的で代謝経路を研究又は操作するために有用である。植物細胞での核酸発現の関心が大いに広まっているとすれば、容易に使用できるように設計されたベクターの必要性も存在する。これらの必要性を満たすことが本発明の目的である。

多様なタイプのベクターが植物細胞を形質転換する目的で構築されてきた。同時組み込みベクターは、植物細胞のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換のために操作された腫瘍誘導ハイブリッドプラスミドであり、細菌プラスミドとアグロバクテリウムの内因性腫瘍誘導プラスミドのトランスファーDNA (T-DNA) との相同組換えによって構築される (Zambryski et al., 1983, EMBO J. 2: 2143-2150)。二元性ベクターは、ビルレンス遺伝子がT-DNA領域を保有するプラスミドとは別個のプラスミドに配置されているベクターである (Bevan, 1984, Nucl. Acids. Res. 12: 8711-8721)。T-DNA二元性ベクターの開発は、それらが組換えを必要としないために植物細胞の形質転換をいっそう容易にした。

【0003】

植物で発現される二元性ベクターのサイズは細菌性プラスミドと比較して相対的に大きく、さらに一般的にそれらはコピー数が小さい。それらの低コピー数と同様に二元性ベクターのサイズは、そのようなベクターでの遺伝子クローニング、特に高処理スクリーニングの障害となる。マルチコピー二元性ベクターが開発され容易なクローニングを促進したが、植物の核ゲノムへの組み込み及び二元性ベクターの骨格配列の組み込みを生じる傾向がある。マルチコピーT-DNAの組み込みは望ましいことではない。なぜならば、そのような組み込みは、移転核酸及び前記核酸によってコードされるタンパク質の低発現又は無発現に至る転写後遺伝子サイレンシングをもたらす可能性が高いからである。ベクター骨格DNAの組み込みもまた、前記骨格が細菌で機能する細菌性配列を含むので規制の見地から望ましくない。アラビドプシス (Arabidopsis) 及びタバコについて、分析されたトランスジェニック植物の50%までがベクター骨格配列（左T-DNA境界配列又は右T-DNA境界配列に連結されてある）を含んでいることが報告された。ニコチアナ・タバカム (N. tabacum) W38については、PCR及びサザンブロット分析で確認したとき、トランスジェニック植物の75%までがベクター骨格配列を含んでいた。これらの植物では、ベクター骨格配列は、T-DNAの左境界又はT-DNAの右境界と連結されていた (Kononov et al., 1997, Plant J. 11: 945-957)。

【0004】

W001/18192は、アグロバクテリウムによる植物の形質転換のための二元性ベクターを開示する。5970bpのpMRT1118は以下を含む：大腸菌 (E. coli) での選別マーカー (nptIII)；互いに隣接してプラスミド上に位置する2つの複製起点 (RK2複製起点及びoriColE1)；複製イニシエータータンパク質のための遺伝子 (trfA)；アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) の左及び右境界 (LB及びRB)；植物で発現できる選別性マーカー（プロモーターPnos及びターミネーターTnos下にあるnptII）；及びさらに別の対象遺伝子をクローニングするために適切なマルチクローニング部位。

多くの二元性ベクターが安定的発現又は一過性発現のために開発されたが、それらの使用は限定的な数の植物種に限られる。多様な研究的及び工業的目的に使用できる改善された二元性ベクターに対する継続的要求が存在する。トランスジェニック植物を作製するためにベクターを用いるとき、ベクターの骨格配列を含まずにただ1つのコピーが組み込まれることが好ましい。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、基本的に大腸菌及びアグロバクテリウムでの維持及び植物細胞の形質転換に必須であるエレメントのみを含む二元性ベクターを提供し、ベクターのサイズの顕著な減少をもたらす。本発明のベクターは、植物及び植物細胞の安定的形質転換と同様に一過性形質転換での使用に適切である。驚くべきことに、そのようなベクターの使用は、一コピートランスジェニックタバコ植物において右T-DNA境界接合部にベクター骨格の挿入を全くもたさず、前記トランスジェニックタバコ植物の約25%のみが左T-DNA境界接合部にベクター骨格配列を含んでいた。本発明のベクターは、植物及び植物細胞（例えばニコチアナ・タバタム及びN.ベンタミアナ（N.benthamiana））へのアグロバクテリウム媒介デリバリー後に1つ以上の遺伝子の発現を可能にした。

本ベクターのさらに別の使用には、例えば潜在性核酸配列のプロモーター活性又は機能について、組織特異的発現（遺伝子発現生成物の細胞内分布の指令を含む）についてのスクリーニングが含まれる。本発明のベクターは、多様な植物種の細胞で対象ポリペプチドの一過性発現と同様に安定的発現のために使用でき、特にニコチアナ属の植物での使用に適切である。

【0006】

したがって、本発明の第一の態様では、以下の核酸エレメントを含む、前記から成る、又は本質的に前記から成るベクター分子が提供され、ここで、これら核酸エレメントは、環状ポリヌクレオチド上で提供され、さらに複製、維持又は核酸移転で機能をもたないギャップヌクレオチド配列によって分離されており、前記ギャップヌクレオチド配列は総計ベクターサイズの20%、25%、30%、35%、40%、45%未満を占める：

- a) 大腸菌（*Escherichia coli*）及びアグロバクテリウム種で機能する選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む第一の核酸エレメント；
- b) 大腸菌で機能する第一の複製起点のヌクレオチド配列を含む第二の核酸エレメント；
- c) 複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む第三の核酸エレメント；
- d) 第一の複製起点と異なりアグロバクテリウムで機能する、第二の複製起点のヌクレオチド配列を含む第四の核酸エレメント；及び
- e) 腫瘍誘導アグロバクテリウム・ツメファシエンズプラスミド又はアグロバクテリウム・リゾゲネス（*A. rhizogenes*）の根誘導プラスミドのT-DNA右境界配列及びT-DNA左境界配列を含むT-DNA領域のヌクレオチド配列を含む第五の核酸エレメント。

【0007】

具体的な実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで

- (i) T-DNA左境界配列及び選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列（a）は、300bpを超えない第一のギャップヌクレオチド配列によって分離され；
- (ii) 選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列（a）及び第一の複製起点のヌクレオチド配列（b）は200bpを超えない第二のギャップヌクレオチド配列によって分離され；
- (iii) 第一の複製起点のヌクレオチド配列（b）及び複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列（c）は、200bpを超えない第三のギャップヌクレオチド配列によって分離され；
- (iv) 複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列（c）及び第二の複製起点のヌクレオチド配列（d）は、500bpを超えない第四のギャップヌクレオチド配列によって分離され；

(v) 第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) 及びT-DNA右境界配列は150bpを超えない第五のギャップヌクレオチド配列によって分離される。

【0008】

本発明のある種の実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子は、5900bp未満、5500bp未満、5200bp未満、又は5100bp未満の総計サイズを有する。

具体的な実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子は5150bpの総計サイズを有する。

本発明の別の具体的実施態様では、本発明に対応しさらに先行するパラグラフのいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、核酸エレメント (a) から (e) は、本発明の第一の実施態様に示す順序で (すなわち (a) (b) (c) (d) (e)) 当該ベクター分子上に互いに対して直線状に配置される。

当業者は、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子を容易に作製することができ、前記ベクター分子は、先行する実施態様のいずれか1つに規定される核酸エレメント (a) から (e) を異なる順序で含む骨格を含む。

したがって、本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで大腸菌及びアグロバクテリウム細胞で機能する選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (a) は、T-DNA左境界配列の基部に位置する。具体的な実施態様では、大腸菌及びアグロバクテリウム細胞で機能的な選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (a) 及びT-DNA左境界配列は、300bpを超えないギャップヌクレオチド配列によって分離される。

【0009】

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、大腸菌及びアグロバクテリウム細胞で機能する選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (a) は、T-DNA右境界配列の基部に位置する。具体的な実施態様では、大腸菌及びアグロバクテリウム細胞で機能する選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (a) 及びT-DNA右境界配列は、150bpを超えないギャップヌクレオチド配列によって分離される。

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第一の複製起点のヌクレオチド配列 (b) 及び第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) を含む核酸エレメントは、T-DNA左境界配列及びT-DNA右境界配列の基部にそれぞれ位置する。

本発明の具体的な実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) は互いに直接隣接しているのではなく、当該ベクターの少なくとも1つの他の機能的エレメントが、第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) を引き離す。

本発明の別の具体的実施態様では、第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) はCol Elori及びRK2oriVから成る群からそれぞれ選択される。

【0010】

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第一の複製起点のヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (b) はT-DNA左境界配列の基部に位置し、さらに第二の複製起点のヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (d) はT-DNA右境界配列の基部に位置する。

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第一の複製起点のヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (b) はT-DNA右境界配列の基部に位置し、さらに第二の複製起点のヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (d) はT-DNA左境界配列の基部に位置する。

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに

10

20

30

40

50

規定されるベクター分子が提供され、ここで、第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) は互いに直接隣接しているのではなく、当該ベクターの少なくとも1つの他の機能的エレメントが、第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) を引き離す。

別の実施態様では、第一の複製起点 (b) 又は第二の複製起点 (d) のヌクレオチド配列を含む核酸エレメント及びT-DNA左境界配列は、300bpを超えないギャップヌクレオチド配列によって分離される。さらに別の実施態様では、第一の複製起点 (b) 又は第二の複製起点 (d) のヌクレオチド配列を含む核酸エレメント及びT-DNA右境界配列は、150bpを超えないギャップヌクレオチド配列によって分離される。

【0011】

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) のヌクレオチド配列を含む核酸エレメントは互いに隣接し、T-DNA左境界配列の基部に位置する。具体的実施態様では、第一の複製起点のヌクレオチド配列 (b) 又は第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) を含む核酸エレメント及びT-DNA左境界配列は、300bpを超えないギャップヌクレオチド配列によって分離され、さらに第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) のヌクレオチド配列を含む核酸エレメントは、200bpを超えないギャップヌクレオチド配列によって分離される。

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) のヌクレオチド配列を含む核酸エレメントは互いに隣接し、T-DNA右境界配列の基部に位置する。本発明の具体的実施態様では、先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第一の複製起点のヌクレオチド配列 (b) 又は第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) を含む核酸エレメント及びT-DNA右境界配列は、150bpを超えないギャップヌクレオチド配列によって分離され、さらに第一の複製起点 (b) 及び第二の複製起点 (d) のヌクレオチド配列を含む核酸エレメントは、500bpを超えないギャップヌクレオチド配列によって分離される。

【0012】

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (c) は、第一の複製起点のヌクレオチド配列 (b) 及び第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) を含む核酸エレメントによってフランキン

グされる。本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、大腸菌及びアグロバクテリウム細胞で機能する選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (a) は、第一の複製起点のヌクレオチド配列 (b) 及び第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) を含む核酸エレメントによってフランキングされる。具体的な実施態様では、第一の複製起点のヌクレオチド配列 (b) 及び第二の複製起点のヌクレオチド配列 (d) を含むフランキング核酸エレメントは、複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (c) 又は大腸菌及びアグロバクテリウム細胞で機能する選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (a) から、200bpを超えないギャップヌクレオチド配列及び500bpを超えないギャップヌクレオチド配列によってそれぞれ分離される。

【0013】

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、核酸エレメント (a) は、大腸菌及びアグロバクテリウム細胞で機能する選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む。選別性マーカーは、抗生物質耐性、特にアンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン、テトラサイクリン、ゲンタマイシン、スペクチノマイシン、ブレオマイシン、フレオマイシン、リファンピシン、ストレプトマイシン及びブラスチジジンSから成る群から選

扱される抗生物質に対する耐性である。

本発明のある種の実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、核酸エレメント (b) は、ColE1複製起点、ColE1不和合性グループに属する複製起点；pMB1複製起点、及び不和合性グループFI、FII、FIII、FIV、I、J、N、O、P、Q、T又はWのいずれか1つに属する複製起点から成る群から選択される、大腸菌で機能する第一の複製起点のヌクレオチド配列を含む。

【0014】

本発明の具体的な実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、核酸エレメント (b) はColE1複製起点の核酸を含む。ColE1複製起点は、例えばpBluescriptベクター (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) から入手できる。

10

本発明の別の具体的な実施態様では、本発明は、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子を提供し、ここで核酸エレメント (b) はpMB1複製起点の核酸を含む。pMB1複製起点は、2つのRNA (RNAI及びRNAII) 及びRom又はRopとして知られる1つのタンパク質をコードする。例えば、pMB1複製起点は、pGEMベクター (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 又はpUCベクター (例えばpUC8 (GenBank:L08959.1) であるが、ただし前記に限定されない) の複製起点であり、高コピー数をもたらすことができる。

ある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、核酸エレメント (c) は、RK2 TrfA複製イニシエータータンパク質である複製イニシエータータンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【0015】

本発明のある種の実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、核酸エレメント (d) は第二の複製起点のヌクレオチド配列を含む。前記核酸エレメントは、第一の複製起点とは異なりさらにアグロバクテリウムで機能し、以下から成る群から選択されるヌクレオチド配列を含む：最小oriV複製起点、RK2 oriV及び不和合性グループFI、FII、FIII、FIV、I、J、N、O、P、Q、T又はWのいずれか1つに属する複製起点。

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第二の核酸エレメント (b) 又は第四の核酸エレメント (d) は複製起点 (oriV) であり、さらに第三の核酸エレメント (c) は、広宿主域プラスミドRK2のTrfA複製イニシエータータンパク質 (大腸菌及びアグロバクテリウム亜種の両方で機能する) である (Schmidhauser and Helinski (1985). J. Bacteriol. 164: 446-455)。

30

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、第五の核酸エレメント (e) は、2つのT-DNA境界配列、すなわちT-DNA左境界配列及びT-DNA右境界配列を含む。

【0016】

本発明のある種の実施態様では、核酸エレメント (e) は、ノパリンファミリーであるアグロバクテリウム亜種のT-DNA境界配列を含み、前記はノパリン、ノパリン酸、ロイシノピン、グルタミノピン又はスクシナモピンを触媒できる。

40

本発明のまた別の実施態様では、核酸エレメント (e) は、オクトピンファミリーであるアグロバクテリウム亜種株のT-DNA境界配列を含み、前記はオクトピン、オクトピン酸、リゾピン又はヒストピンを触媒できる。本発明のある種の実施態様では、核酸エレメント (e) は、マンニチルファミリーであるアグロバクテリウム亜種のT-DNA境界配列を含み、前記はマンノピン、マンノピン酸、アグロピン又はアグロピン酸を触媒する。

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、アグロバクテリウム・ツメファシエンス腫瘍誘導プラスミド又はアグロバクテリウム・リゾゲネスの根誘導プラスミドのT-DNA右境

50

界配列及びT-DNA左境界配列を含むT-DNA領域のヌクレオチド配列を含む核酸エレメント (e) は、少なくとも1つの固有の制限エンドヌクレアーゼ切断部位、特に少なくとも2つの、3つの、4つの又は5つの固有の制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含む。

【0017】

前記制限エンドヌクレアーゼ切断部位は以下から成る群から選択される切断部位であり得る：AatII、Acc65I、AclI、AflII、AflIII、AhdI、AloI、ApaBI、ApaI、AseI、AsiSI、AvrII、BaeI、BamHI、BanII、Bbr7I、BbsI、BbvCI、BfrBI、BlpI、BmtI、BplI、BpmI、Bpu10I、BsaAI、BsaI、BsaXI、BsiWI、BspEI、BsrGI、BstAPI、BstBI、BstZ17I、Bsu36I、DraIII、EcoICRI、EcoNI、EcoRI、FalI、FseI、FspAI、HindIII、HpaI、KpnI、M.AclI、M.AflIII、M.AloI、M.ApaI、M.BaeI、M.BanII、M.BbvCIA、M.BbvCIB、M.BnaI、M.BsaAI、M.BstI、M.BstVI、M.DraIII、M.EcoAI、M.EcoKI、M.EcoR124I、M.HindIII、M.HpaI、M.KpnBI、M.KpnI、M.MunI、M.PaeR7I、M.PhiBssHII、M.PshAI、M.Rrh4273I、M.SacI、M.SalI、M.Sau3239I、M.SnaBI、M.Tth111I、M.VspI、M.XbaI、M.XhoI、MfeI、MluI、NheI、NruI、NsiI、PciI、PmlI、Ppu10I、PshAI、PspOMI、PsrI、RsrII、SacI、SalI、SanDI、SapI、SciI、SnaBI、SrfI、SwaI、Tth111I、XbaI、XhoI、XmnI及びZraI。そのような切断部位は、コンパチブル5'末端、コンパチブル3'末端、又は1つ若しくは2つの平滑端を含む任意のDNA（例えば発現カセット）の挿入を受け入れる。

ある実施態様では、前記発現カセットは、植物（特にニコチアナ属の植物）で機能を有する調節性エレメント及び対象となるヌクレオチド配列を含む。

【0018】

当業者は、当該ベクターの特性を変化させることなく、エンドヌクレアーゼ認識部位を含む核酸の1つ以上の塩基対を変異又は変化させることによって、1回（或いは2回以上）切断する前記エンドヌクレアーゼ認識を容易に除去できる。コード配列、調節配列又は当該ベクターにとって必須の機能を有する他の配列の外側に存在するそのような制限エンドヌクレアーゼ認識部位のいずれも、当該ベクターの特性及び機能に影響を及ぼすことなく改変できることは理解されよう。同様に、サイレント変異を導入することによって、タンパク質をコードするフラグメント内に含まれる配列を前記タンパク質の機能を変化させることなく変異させ得ることは理解されよう。当業者には、固有の制限部位又はクローニング目的のいずれの制限部位若しくは部位の組合せも必要としないかもしれないことは理解されよう。なぜならば、植物細胞での発現のための核酸配列又は他の任意の核酸配列はまた、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子の核酸エレメント (a) から (e) と一緒に設計及び化学的に合成することによって、制限エンドヌクレアーゼを使用することなくベクターのT-DNA領域又は他の場所に直接取り込むことができるからである。

【0019】

本発明はまた先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子を提供し、ここで、第五の核酸エレメント (e) はさらに、T-DNA右境界配列及びT-DNA左境界配列の間に形質転換植物又は植物細胞で機能を有する調節エレメントを含み、前記調節エレメントは、ヌクレオチド配列を前記ベクター分子に挿入するとき対象タンパク質をコードする当該ヌクレオチドに作動できるように連結されるであろう。そのようなベクター分子は、対象ヌクレオチド配列の挿入のために容易に用いることができる。1つ以上の固有の制限切断部位が調節エレメントとT-DNA境界配列の一方との間に存在し、対象のヌクレオチド配列の挿入を容易にできる。したがって、ある種の実施態様では、本発明はさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子を提供し、ここで、第五の核酸エレメント (e) はさらに、T-DNA右境界配列とT-DNA左境界配列との間に、植物細胞で機能し、対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列と作動できるように連結された調節エレメントを含む。

本発明の多様な実施態様では、T-DNA領域に存在する調節エレメントは、以下から成る群から選択されるプロモーターである：カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス改変35Sプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス

ニ35Sプロモーター、最小35Sプロモーター、ノパリンシンターゼプロモーター、ササゲモザイクウイルスプロモーター、HT-CPMVプロモーター、タバココパリルシンターゼCPS2pプロモーター、ジヒドリニンプロモーター、プラストシアニンプロモーター、35S/HT-CPMVプロモーター、及びカウリモウイルス（例えば以下であるが、ただしこれらに限定されない：ミラビリス（*mirabilis*）モザイクウイルス（MMV）、フィグワート（*figwort*）モザイクウイルス（FMV）、落花生白線（*penut chlorotic streak*）ウイルス（PCLSV））から誘導される多くの他のプロモーター、ニCaMV35Sプロモーター（35Sx2）、ニMMVプロモーター（MMVx2）及びニFMVプロモーター（FMVx2）。

【0020】

本発明のある種の実施態様では、植物の調節エレメントの制御下にあるヌクレオチド配列は、植物細胞で機能する選別性マーカー（特に抗生物質耐性、農薬耐性から成る群から選択される選別性マーカー）、及び視覚的に認識可能な特徴を生じるレポータータンパク質又はポリペプチドをコードする。

植物の選別性マーカーは、アミノグリコシド抗生物質（例えばカナマイシン又はネオマイシン）、農薬（例えばホスフィノトリシン又はグルホシネート）に対する耐性を提供するマーカーであり得る。また別には、選別性マーカーは、スクリーニング可能マーカー、例えば蛍光タンパク質（緑色蛍光タンパク質（GFP）を含むがただし前記に限定されない）であり得る。

しかしながら一過性発現の目的のためには、植物で使用される選別性マーカーの有用性は極めて低く、ベクターから省略することができる。これによってベクターサイズのさらに顕著な減少が可能になる。例えば、実施例の節1.3に示すように、pPMP1は、カナマイシン耐性をコードするpBIN61由来ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（*nptII*）をpC100から欠失させることによって構築された。したがって、pPMP1は、植物の選別性マーカーを欠く本発明のベクターの例である。

【0021】

したがって、本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、植物の選別性マーカーは省略されてある。

本発明の多様な実施態様では、植物又は植物細胞で発現される対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、抗原、免疫原、ワクチンの活性成分、サイトカイン、ケモカイン、血液タンパク質、ホルモン、酵素、成長因子、抗体又はそのフラグメント、及び遺伝子サイレンシングのサプレッサーをコードするが、ただしこれらに限定されない。

対象タンパク質又はポリペプチドは、呼吸器合胞体形成ウイルス（RSV）、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、肝炎ウイルス又はノーウォークウイルスから単離又は誘導される抗原又は免疫原であり得る。

具体的な実施態様では、ウイルス様粒子はインフルエンザヘマグルチニン5（H5）を含む（H5は、実施例4に開示するように、最小ベクターから誘導したpC229ベクターを用いてニコチアナ・タバカム植物細胞で良好に産生された）。インフルエンザウイルスは、ヒト、家畜（例えばブタ、ニワトリ、アヒル）又は野生動物（例えば渡り鳥）から単離できる。

タンパク質又はポリペプチドはまた、酵素、例えばグルコセレブロシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、エステラーゼ又はヒドロラーゼであり得る。

【0022】

ある種の実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、前記ベクター分子はさらに、新規に発現される対象タンパク質を細胞内の位置に誘導するシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をT-DNA領域内に含む。本発明のベクター分子内で用いることができるシグナルペプチドは、例えば以下から成る群から選択されるものである：空胞ターゲティング配列、葉緑体ターゲティング配列、ミトコンドリアターゲティング配列、植物細胞でタンパク質小体の形成を誘導する配列、又は植物細胞で油滴の形成を誘導する配列。

本発明のある実施態様では、ターゲティング配列は小胞体へのタンパク質移入のためのシグナルペプチドである。シグナルペプチドは、タンパク質の最N-末端に位置し、翻訳と同時に小胞体膜の貫通移転中に切断される輸送ペプチドである。本発明のベクター分子で用いることができるシグナルペプチドは、IgGの軽鎖若しくは重鎖配列のN-末端に天然に存在するもの、又は実施例3に記載するpC148のパタチンシグナルペプチドであるが、ただしこれらに限定されない。さらに別のシグナルペプチドは、例えばSignalP予測ツール (Emanuelsson et al., 2007, Nature Protocols 2: 953-971) によって予測することができる。

【0023】

本発明の別の実施態様では、ターゲティング配列は小胞体残留ペプチドであり得る。小胞体残留ターゲティング配列は、タンパク質の最C-末端に存在し、4アミノ酸 (例えばKDEL、HDEL又はDEL) であり得る (式中、Kはリジン、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Lはロイシン、Hはヒスチジンである)。

本発明のさらにまた別の実施態様では、ターゲティング配列は、タンパク質と融合させたとき、小胞体中で非分泌性貯蔵細胞小器官の形成をもたらす配列であり得る。前記は、例えばW007/096192、W006/056483及びW006/056484に記載されたものであるが、ただしこれらに限定されない。

本発明のある種の実施態様では、ターゲティング配列は空胞ターゲティング配列、葉緑体ターゲティング配列、ミトコンドリアターゲティング配列、又は任意の他の配列であってその付加が前記任意の配列に融合されたタンパク質の、植物又は植物細胞中の特定の細胞小器官へのターゲティングを生じるものであり得る。

【0024】

ある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子はさらに、部位特異的組換えのための部位特異的組換え部位をT-DNA領域内に含む。

ある実施態様では、部位特異的組換え部位は植物調節性エレメントの下流に位置する。別の実施態様では、部位特異的組換え部位は植物調節性エレメントの上流に位置する。

本発明の具体的な実施態様では、組換え部位は、LoxP部位及びCre-Lox部位特異的組換え系の部分である。

Cre-Lox部位特異的組換え系は、環状リコンビナーゼ (Cre) を利用する (Creは、Creに特異的な結合部位を含む固有部位 (LoxP) 間の組換えを触媒する)。

別の具体的な実施態様では、組換え部位はゲートウェイ送付部位である。例えば、対象の核酸は第一に市販の“エントリーベクター”にクローニングされ、続いて“送付ベクター”で組換えが生じる。送付ベクターは、ある核酸配列又は多数の配列のプロモーター活性の分析、機能の分析、タンパク質の位置決定に、タンパク質-タンパク質相互作用の分析に、ある遺伝子のサイレンシングに、又はアフィニティー精製実験に用いることができる。

本発明のある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子が提供され、ここで、ベクターは、植物細胞で機能を有する調節エレメントの制御下にある植物選別性マーカー遺伝子、及び部位特異的組換えのための組換え部位をT-DNA領域内に含み、前記組換え部位は、T-DNA右境界配列と植物選別性マーカー遺伝子との間に位置する。

【0025】

本発明の別の実施態様では、先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子は、遺伝子サイレンシングのサプレッサーをコードするヌクレオチド配列を含む。

本発明のある種の実施態様では、遺伝子サイレンシングのサプレッサーはウイルス起源であり、特にウイルスは以下から成る群から選択される：ハーベルリバーウイルス (Hairy root virus (HaRV))、ナシ潜伏ウイルス (PeLV)、リシアンタス壊死ウイルス、ブドウアルジェリア潜伏ウイルス、ペラルゴニウム壊死斑ウイルス (PeNSV)、シンビジウムリングスポットウイルス (CymRSV)、アーティチョークモットルクリンクル (mottled

10

20

30

40

50

crinkle) ウイルス (AMCV)、カーネーションイタリアンリングスポットウイルス (CIRV)、レタス壊死萎縮病ウイルス、イネ黄斑ウイルス (RYMV)、ジャガイモXウイルス (PVX)、アフリカキャッサバモザイクウイルス (ACMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、キュウリ壊死ウイルス (CNV)、ジャガイモYウイルス (PVY)、又はトマトブッシースタントウイルス (TBSV)。

【0026】

本発明のある種の実施態様では、遺伝子サイレンシングのサプレッサーは、タバコエッチウイルス (TEV) のヘルパー成分プロテインナーゼ (HcPro)、イネ黄斑ウイルス (RYMV) のp1タンパク質、ジャガイモウイルスX (PVX) のp25タンパク質、アフリカキャッサバモザイクウイルス (ACMV) のAC2タンパク質、キュウリモザイクウイルス (CMV) の2bタンパク質、キュウリ壊死ウイルス (CNV) の19kDa p19タンパク質、トマトブッシースタントウイルス (TBSV) のp19タンパク質、又はジャガイモウイルスY (PVY) 若しくはトマトブッシースタントウイルス (TBSV) のヘルパー成分プロテインナーゼ (HcPro) である。

本発明の具体的な実施態様では、遺伝子サイレンシングのサプレッサーは、Malloryら (2001. Plant Cell 13: 571-583) が開示し、さらにインフルエンザH5ウイルス様粒子の生成のために実施例4で例示したタバコエッチウイルス (TEV) のHcPro、又はリツキシマブモノクローナル抗体をタバコで生成するために実施例3で用いて成功したトマトブッシースタントウイルス (TBSV) のp19タンパク質である。

【0027】

ある実施態様では、本発明は、配列番号：1に示すポリヌクレオチド配列と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるポリヌクレオチド配列を有するベクター分子に関し、ここで核酸エレメント (a) から (e) は、配列番号：1に提供される対応エレメントと同じ機能性を示す。

具体的な実施態様では、ベクター分子は配列番号：1に記載のポリヌクレオチド配列を有する。

本発明のベクター及び先行する実施態様のいずれか1つに規定され、そのようなベクターに含まれる核酸エレメント (a) から (e) は、環状DNAプラスミドに共有結合された天然に存在する核酸配列又は化学的に合成された核酸配列であるか又は前記の混合物であり得る。化学的に合成されるとき、核酸エレメント (a) から (e) は、細菌又は他の対象生物の天然に存在する核酸及びタンパク質又はポリペプチドを土台にし、天然に存在する配列と同じ機能性を有することができる。

本発明はまた、細菌細胞 (特に以下から成る群から選択される細菌細胞：リゾビウム (Rhizobium)、シノリゾビウム (Sinorhizobium)、メソリゾビウム (Mesorhizobium)、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium)、シュードモナス (Pseudomonas)、アゾスピリillum (Azospirillum)、ロドコッカス (Rhodococcus)、フィロバクテリウム (Phyllobacterium)、キサントモナス (Xanthomonas)、ブルクホルデリア (Burkholderia)、エルウイニア (Erwinia)、バシルス (Bacillus)、エシェリキア (Escherichia) 及びアグロバクテリウム) を包含し、前記細菌細胞は、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子を含む。

【0028】

具体的な実施態様では、本発明はアグロバクテリウム細胞 (特にアグロバクテリウム・ツメファシエンス又はアグロバクテリウム・リゾゲネス) に関し、前記は、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子を含む。

別の具体的な実施態様では、本発明は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス株の細胞 (アグロバクテリウム株AGL1、EHA105、GV2260、GV3101及びChry5から成る群から選択されるが、特にアグロバクテリウム・ツメファシエンス株AGL1又はEHA105) に関し、前記は、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子を含む。

本発明はまた、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベ

クターを含む植物又は植物細胞を包含する。

好ましい実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定される植物又は植物細胞、特に本発明のベクター分子によって形質転換されてあるニコチアナ・タバクムの植物又は植物細胞は、T-DNA領域又はその機能的部分のただ1つのコピーを含み、前記コピーは、左T-DNA境界に隣接するベクター配列又は右T-DNA境界に隣接するベクター配列又はその両方のベクター配列を含むことなく植物ゲノムに組み込まれる。

【0029】

植物は単子葉植物でも双子葉植物でもよく、前記にはニコチアナ属の植物が含まれるが、ただしこれらに限定されない。ニコチアナ属の例示的な種には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：ニコチアナ・アフリカーナ (*Nicotiana africana*)、ニコチアナ・アンプレキシカウリス (*Nicotiana amplexicaulis*)、ニコチアナ・アレツィー (*Nicotiana arentsii*)、ニコチアナ・ベンタミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ニコチアナ・ビゲロビー (*Nicotiana bigelovii*)、ニコチアナ・コリンボサ (*Nicotiana corymbosa*)、ニコチアナ・デブネイー (*Nicotiana debneyi*)、ニコチアナ・エクセルシア (*Nicotiana excelsior*)、ニコチアナ・エクシグア (*Nicotiana exigua*)、ニコチアナ・グルチノサ (*Nicotiana glutinosa*)、ニコチアナ・グードスピーディー (*Nicotiana goodspeedii*)、ニコチアナ・ゴッセイ (*Nicotiana gossei*)、ニコチアナ・ヘスペリス (*Nicotiana hesperis*)、ニコチアナ・イングルバ (*Nicotiana ingulba*)、ニコチアナ・クニグチアナ (*Nicotiana knightiana*)、ニコチアナ・マリチマ (*Nicotiana maritima*)、ニコチアナ・メガロシフォン (*Nicotiana megalosiphon*)、ニコチアナ・ミエルシー (*Nicotiana miersii*)、ニコチアナ・ネソフィラ (*Nicotiana nesophila*)、ニコチアナ・ノクチフローラ (*Nicotiana noctiflora*)、ニコチアナ・ヌジカウリス (*Nicotiana nudicaulis*)、ニコチアナ・オトフォラ (*Nicotiana otophora*)、ニコチアナ・パルメリ (*Nicotiana palmeri*)、ニコチアナ・パニクラタ (*Nicotiana paniculata*)、ニコチアナ・ペツニオイデス (*Nicotiana petunioides*)、ニコチアナ・ブルムバギニフォリア (*Nicotiana plumbaginifolia*)、ニコチアナ・レパンダ (*Nicotiana repanda*)、ニコチアナ・ロスラタ (*Nicotiana rosulata*)、ニコチアナ・ロツンジフォリア (*Nicotiana rotundifolia*)、ニコチアナ・ルスチカ (*Nicotiana rustica*)、ニコチアナ・セチェリー (*Nicotiana setchellii*)、ニコチアナ・ストックトニー (*Nicotiana stocktonii*)、ニコチアナ・エアスチー (*Nicotiana eastii*)、ニコチアナ・スアベオレンス (*Nicotiana suaveolens*) 又はニコチアナ・トリゴノフィラ (*Nicotiana trigonophylla*)。望ましくは、第一のタバコの植物は、ニコチアナ・アンプレキシカウリス、ニコチアナ・ベンタミアナ、ニコチアナ・ビゲロビー、ニコチアナ・デブネイー、ニコチアナ・エクセルシア、ニコチアナ・グルチノサ、ニコチアナ・グードスピーディー、ニコチアナ・ヘスペリス、ニコチアナ・クニグチアナ、ニコチアナ・マリチマ、ニコチアナ・メガロシフォン、ニコチアナ・ヌジカウリス、ニコチアナ・パニクラタ、ニコチアナ・ブルムバギニフォリア、ニコチアナ・レパンダ、ニコチアナ・ルスチカ、ニコチアナ・スアベオレンス又はニコチアナ・トリゴノフィラである。

【0030】

具体的な実施態様では、本発明は、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクターを含む植物又は植物細胞に関し、ここで、前記植物又は植物細胞はニコチアナ・タバクムの植物である。ニコチアナ・タバクムの例示的な品種には例えば以下の商業品種が含まれる：DAC Mata Fina、81V9、Ottawa 705、Labu、Tl 115、ハバナ (Havana) 307、キササンシー (Xanthi)、Tl90、ケンタッキー16、ハバナ38、ウィスコンシン (Wisconsin) 38、Con. Havana 38、バーレイ49、81V9 MS、ジュディーズプライド (Judy's Pride)、CT 572、Tl 158、キャネル (Cannelle)、Tl 94、CT 157、ホワイトマンモス (White Mammoth)、ケリー (Kelly)、ゴールドダラー (Gold Dollar)、ホワイトゴールド (White Gold)、ボナンザ (Bonanza)、ハバナ425、デルフィールド (Delfield)、コーカー (Coker) 48、デーリー (Dehli) 76、イエローマンモス (Yellow Mammoth)、バーレイ1、デルゴールド (Delgold)、グリーンブライアー (Green Briar)、Tl

161、メリーランド (Maryland) 201、ダッケスン (Duquesne)、CT 681、Tl 170、Tl 164、ケンタッキー10、Bell C、Tl 75、ビニカ (Vinica)、グランドルージュ (Grande Rouge)、ベルギー (Belgique) 3007、I 64、Tl 124、Tl 95、P02、BY-64、AS44、RG17、RG8、HB04P、バスマキサンシー (Basma Xanthi) BX 2A、コーカー319、ヒックス (Hicks)、マクネアー (McNair)、944 (MN 944)、バーレイ21、K149、Yaka JB 125/3、カスツリメイワ (Kasturi Mawar)、NC 297、コーカー371ゴールド、ウィスリカ (Wislica)、シンマバ (Simmaba)、ターキッシュサムスン (Turkish Samsun)、AA37-1、B13P、BU21とホヤパラド (Hoja Parado) との交配のF4、系統97、サムスン (Samsun)、P01BU 64、C C 101、CC 200、CC 27、CC 301、CC 400、CC 500、CC 600、CC 700、CC 800、CC 900、コーカー176、コーカー319、コーカー371ゴールド、コーカー48、CU 263、DF911、ガルパオタバコ (Galpao tobacco)、GL 26H、GL 350、GL 737、GL 939、GL 973、HB 04P、K 149、K 326、K 346、K 358、K 394、K 399、K 730、KT 200、KY 10、KY 14、KY 160、KY 17、KY 171、KY 907、KY 160、リトルクリッテンデン (Little Crittenden)、マクネアー373、マクネアー944、msKY 14.times.L8、ナローリーフマドレー (Narrow Leaf Madole)、NC 100、NC 102、NC 2000、NC 291、NC 297、NC 299、NC 3、NC 4、NC 5、NC 6、NC 606、NC 71、NC 72、NC 810、NC BH 129、OXFORD 207、ペリークタバコ ('Perique' tobacco)、PM016、PM021、PM092、PM102、PM132、PM204、PM205、PM215、PM216、PM217、PVH03、PVH09、PVH19、PVH50、PVH51、R 610、R 630、R 7-11、R 7-12、RG 17、RG 81、RG H4、RG H51、RGH 4、RGH 51、RS 1410、SP 168、SP 172、SP 179、SP 210、SP 220、SP G-28、SP G-70、SP H20、SP NF3、TN 86、TN 90、TN 97、TN D94、TN D950、TR (トムロッシン (Tom Rosson)) マドレー、VA 309、VA 309、VA 359、キサンシー (ミッチェル-モー (Mitchell-Mor))、KTRD#3ハイブリッド107、Bel-W3、79-615、サムスンホームズ (Samsun Holmes) NN、N.タバコムBU21とN.タバコムホヤパラドとの交配のF4、系統97、KTRDC#2ハイブリッド49、KTRDC#4ハイブリッド110、バーレイ21、BY-64、KTRDC#5 KY 160 SI、KTRDC#7 FCA、KTRDC#6 TN 86 SI、KY 8959、KY 9、KY 907、MD 609、NC 2000、PG 01、PG 04、P01、P03、RG 11、RG 8、スペイト (Speight) G-28、VA 509、AS44、バンケット (Banquet) A1、バスマドラマ (Basma Drama) B84/31、バスマIジクナ (Zichna) ZP4/B、バスマキサンシーBX 2A、Batek、ベスキジェンバー (Besuki Jember)、C104、コーカー347、クリオロミシオネロ (Criollo Misionero)、デルクレスト (Delcrest)、ジェーベル (Djebel) 81、DVH 405、ガルパオコナム (Galpao Comum)、HB04P、ヒックスブロードリーフ (Hicks Broadleaf)、カバクラックエラソーナ (Kabakulak Elasona)、カスツリメイワ、クツァゲ (Kutsage) E1、KY 14xL8、KY 171、LA BU 21、マクネアー944、NC 2326、NC 71、PVH 2110、レッドラッシアン (Red Russian)、サムスン、サブラック (Saplak)、シンマバ (Simmaba)、タルガー (Talgat) 28、ターキッシュサムスン、ウィスリカ (Wislica)、ヤヤルダグ (Yayaldag)、NC 4、TRマドレー、プリレプ (Prilep) HC-72、プリレプP23、プリレプPB 156/1、プリレプP12-2/1、Yaka JK-48、Yaka JB 125/3、TI-1068、KDH-960、TI-1070、TW136、サムスンNN、Izmir、カラバルガー (Karabalgat)、デニズリ (Denizli)、バスマ (Basma)、TKF 4028、L8、TKF 2002、TN90、GR141、バスマキサンシー (Basma xanthi)、GR149、GR153、プチハバナ (Petit Havana) 又はキサンシーNN。

一過性発現に適切なN. タバコムの好ましい育種系統、品種、栽培品種には、P02、AS44、ウィスリカ、シンマバ、PM132、PM092、PM016、RG17、RG8、HB04P、バスマキサンシーBX 2A、コーカー319、ヒックス、マクネアー944 (MN 944)、バーレイ21、K149、Yaka JB 125/3、PM102、NC 297、PM021、AA37-1、B13P、BU21とホヤパラドとの交配のF4、系統97、サムスン、P01、PM204、PM205、PM215、PM216及びPM217が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0031】

さらに別の具体的な実施態様では、本発明は、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクターを含む植物又は植物細胞に関し、ここで、前記植物又は植物細胞は、以下から成る群から選択されるニコチアナ・タバコム植物の品種、育種

系統又は栽培品種である：ニコチアナ・タバクムPM106（その種子は、NCIMB Ltd.（ブダペスト条約による国際寄託機関、所在地：Ferguson Building, Craibstone Estate, Buck sburn, Aberdeen, AB21 9YA, 英国）に2011年1月6日に受託番号NCIMB41798で寄託された）；PM201（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41799で寄託された）；PM092（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41800で寄託された）；PM102（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41801で寄託された）；PM132（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41802で寄託された）；PM204（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41803で寄託された）；PM205（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41804で寄託された）；PM215（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41805で寄託された）；PM216（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41806で寄託された）；及びPM217（その種子はNCIMB Ltd.に2011年1月6日に受託番号NCIMB41807で寄託された）。特許権交付まで又は当該出願が拒絶若しくは取り下げられた場合には出願の日から20年間、サンプルは請求者が指定した独立した専門家にのみ配布されるであろう（規則13bis.6 PCT）。

10

【0032】

本発明のある実施態様では、本発明は、細菌細胞のトランスフェクション又は植物若しくは植物細胞の形質転換のために、さらに対象核酸を前記植物又は植物細胞で発現させるために、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子の使用を提供する。

本発明の具体的な実施態様では、対象核酸の発現は特定の植物組織又は細胞内の位置に向けられる。

20

本発明のある種の実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子は、植物又は植物細胞、特にニコチアナ・タバクム植物又は植物細胞、特に先行するパラグラフで特定したニコチアナ・タバクム植物の品種、育種系統又は栽培品種のいずれか1つの植物又は植物細胞で、対象遺伝子の安定的又は一過性発現のために用いられる。特に、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子は、細菌の骨格配列無しに一コピー形質転換事象を発生させるために用いられる。

本発明はまた、プロモーター活性又は潜在性核酸の機能をスクリーニングするために用いられるベクター分子を提供する。

30

本出願はベクター分子及びその使用を提供し、前記使用には、1つ以上の対象タンパク質、代謝物又は他の化合物の産生のため、対象核酸の発現の調節のため、植物細胞で調節性機能を有する配列の同定のため、遺伝子及び核酸機能（外因性又は内因性核酸）の同定のため、対象の核酸又はタンパク質の組織特異的発現の指令のため、又は発現タンパク質の植物細胞内又は細胞外の位置への誘導のための、1つ以上の対象となる核酸の植物又は植物細胞における発現が含まれる。

【0033】

ある実施態様では、本発明は、先行する実施態様のいずれかのベクター分子を提供し、前記ベクター分子は、植物又は植物細胞で発現される、対象タンパク質又はポリペプチドをコードするDNAフラグメントを含む核酸エレメントを含む。前記タンパク質又はポリヌクレオチドは、以下から成る群から選択される：成長因子、レセプター、リガンド、シグナリング分子；キナーゼ、酵素、ホルモン、腫瘍抑制剤、血液凝固タンパク質、細胞周期タンパク質、代謝タンパク質、神経タンパク質、心臓タンパク質、特定症状で不足するタンパク質、抗体及び免疫グロブリン又はそのフラグメント、抗原、疾病への耐性を提供するタンパク質、抗菌タンパク質、インターフェロン及びサイトカイン。

40

ある実施態様では、本発明は先行する実施態様のいずれかのベクター分子を提供し、ここで、第五の核酸エレメントはさらに、T-DNA右境界配列とT-DNA左境界配列との間に植物細胞で機能を有する調節性エレメントを含む。

ある実施態様では、本発明は先行する実施態様のいずれかのベクター分子を提供する。前記ベクター分子は、配列番号：1に示すポリヌクレオチド配列と少なくとも80%、81%

50

、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%、特に100%同一であるポリヌクレオチド配列を有し、ここで、前記核酸エレメント (a) から (e) は、配列番号：1で提供される対応エレメントと同じ機能性を示す。

【0034】

ある実施態様では、本発明は先行する実施態様のいずれかのベクター分子を提供し、ここで、第五の核酸エレメントはさらに、T-DNA右境界配列とT-DNA左境界配列との間に、植物細胞で機能を有する調節性エレメントと作動できるように連結された対象タンパク質のコードヌクレオチド配列を含む。

特別な実施態様では、本発明は先行する実施態様のいずれかのベクター分子を提供し、ここで、対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、インフルエンザヘマグルチニン5 (H5)、特に配列番号：24に示すインフルエンザヘマグルチニン5 (H5) である。

10

多様な実施態様で、本発明は植物細胞で対象タンパク質を製造する方法を提供する。前記方法は、先行する実施態様のいずれかのベクターの少なくとも1つを植物細胞に導入する工程を含み、ここで、第五の核酸エレメントはさらに、T-DNA右境界配列とT-DNA左境界配列との間に、植物細胞（特にニコチアナ属の植物の植物細胞）で機能を有する調節性エレメントと作動できるように連結された対象タンパク質のコードヌクレオチド配列を含む。さらにまた包含されるものは、上記に記載した本発明の方法にしたがって調製された植物細胞である。

【0035】

20

本明細書の説明及び例示では、配列リストに提示の以下の配列が参照される：

配列番号：1は最小二元性pPMP1ベクターのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：2はnptII遺伝子のためのPQ24F フォワードプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：3はnptII遺伝子のためのPQ24R リバースプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：4はnptII遺伝子のためのTaqmanプローブのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：5はナイトレートレダクターゼ遺伝子のためのPQ17F フォワードプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：6はタバコナイトレートレダクターゼ遺伝子のためのPQ17R リバースプライマーのヌクレオチド配列を示す。

30

配列番号：7はナイトレートレダクターゼ遺伝子のためのTaqmanプローブのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：8はpCambia-2300のためのPC201F フォワードプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：9はpCambia-2300のためのPC202R リバースプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：10は、pC100のT-DNA左境界に対して-18位から-1位に位置するプライマー1のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：11は、pC100のT-DNA左境界に対して+2位から+25位に位置するプライマー2のヌクレオチド配列を示す。

40

配列番号：12は、pC100のT-DNA左境界の下流+122位から+137位に位置するプライマー3のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：13は、pC100の下部鎖上のT-DNA左境界の下流+264位から+232位に位置するプライマー4のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：14は、pC100のT-DNA右境界の上流上部鎖上の-870位から-848位に位置するプライマー5のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：15は、pC100のT-DNA右境界配列の上流-171位から-151位に位置するプライマー6のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：16は、pC100のT-DNA右境界配列に対して下部鎖上で-26位から-1位に位置す

50

るプライマー7のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：17は、pC100のT-DNA右境界配列の下流+87位から+102位に位置するプライマー8のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：18は、pC100のNPTII遺伝子のアミノ末端の上部鎖上に位置するプライマー9のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：19は、pC100のNPTII遺伝子のカルボキシ末端の下部鎖上に位置するプライマー10のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：20は、最小35S-CaMVプロモーターのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：21は5'UTR HT-CPMVのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：22は3'UTR HT-CPMVのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：23はP1-HcPro-P3のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：24はインフルエンザヘマグルチニン5 (H5) のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：25は、EcoRIとHind3部位との間のpMMV一強化プロモーターフラグメントのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：26は、EcoRIとHind3部位との間のpMMV二強化プロモーターフラグメントのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：27は、EcoRIとHind3部位との間のpFMV一強化プロモーターフラグメントのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：28は、EcoRIとHind3部位との間のpFMV二強化プロモーターフラグメントのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：29は、EcoRIとHind3部位との間のpPCISV一強化プロモーターフラグメントのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：30は、EcoRIとHind3部位との間のpPCISV二強化プロモーターフラグメントのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：31はパタチンシグナルペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号：32は、C148で示されるリツキシマブ成熟重鎖配列（タバコに最適化されている）のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：33は、C148で示されるリツキシマブ成熟重鎖配列（タバコに最適化されている）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：34は、C148で示される、タバコに最適化されていないパタチン配列（わずかに改変されている）を示す（重鎖の前に存在する）。

配列番号：35は、C148で示される、リツキシマブ成熟軽鎖配列（タバコに最適化されている）のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：36は、C148で示される、リツキシマブ成熟軽鎖配列（タバコに最適化されている）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：37は、C148で示される、タバコに最適化されてあるパタチン配列のアミノ酸配列を示す（軽鎖の前に存在する）。

配列番号：38は、合成によってデリバーされた成熟GBA配列（タバコに最適化されてある）のヌクレオチド配列を示す。

配列番号：39は成熟GBAのアミノ酸配列を示す。

配列番号：40は、GBAの前にあるタバコに最適化されたパタチンシグナルペプチドのヌクレオチド配列を示す。

【0036】

本明細書の説明及び例示では、以下の図が参照される：

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1A】植物選択可能最小二元性ベクターpC100の線形表示の模式図を示す（実施例1も参照されたい）。

【図1B】植物選択可能最小二元性ベクターpPMP1の線形表示の模式図を示す（実施例1も参照されたい）。

10

20

30

40

50

【図1C】植物選択可能最小二元性ベクターpMPM1の線形表示の模式図を示す（実施例1も参照されたい）。

【図2】図1C及び実施例1のように線形化したpMPM1のヌクレオチド配列を示す。

【図3】タバコにより生成されたH5のSDS-PAGEゲル（A）及びウェスタンブロット（B）を示す（実施例4も参照されたい）。

【図4】タバコにより生成されたH5のブルーネイティブ-PAGEゲル（A）及びウェスタンブロット（B）を示す（実施例4も参照されたい）。

【図5】タバコ生成H5及び精製H5の血球凝集アッセイを示す（実施例4も参照されたい）。

【図6】植物選択可能最小二元性ベクターpC100のT-DNA領域の詳細通覧、及びトランスジェニック植物における左右T-DNA境界接合部でのベクター骨格の組み込みを決定するために用いられるプライマー1から10の位置を示す（実施例5も参照されたい）。

【図7】pC100誘導ベクターのT-DNA領域の模式図を示す（縮尺率は均一ではない）。LBはT左境界、RBはT右境界、pMMVはミラビリスモザイクウイルスのFLtプロモーター、pFMVはフィグワートモザイクウイルスのFLtプロモーター、pPCISVは落花生白線ウイルスのFLtプロモーター、CaMV35SはカリフラワーモザイクウイルスのFLtプロモーター、プラストシアンinはアルファルファから単離された植物プロモーターである。MCSはHindIII及びSnaBI制限部位を保有するマルチクローニング部位で、t35Sはターミネーター35Sで、tPlastoはプラストシアンターミネーターで、pNOSはノパリンシンターゼプロモーターで、tNOSはノパリンシンターゼターミネーターで、nptIIはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、植物カナマイシン耐性遺伝子である。2x（又はx2と互換的に用いられる）は、2つのエンハンサー配列が存在することを示す。

【図8】最小ベクターで異なる調節性エレメントを用いたときのH5発現レベルの比較結果を示す。サンプルと図の識別及び標識を容易にするために、数字が後に続く文字は、アグロバクテリウム株に浸潤させたDNAベクターを示すために用いられる。例えばA100は、構築物C100で形質転換させた株AGL1に一致する。

【発明を実施するための形態】

【0038】

定義

本出願の中で用いられる技術用語及び学術用語並びに表現は、一般的に、植物生物学の関連分野でそれらに通常適用される意味が与えられるべきである。当業者に公知の多様な方法論が本明細書で参照される。参照されるそのような公知の方法論を記述する刊行物及びその他の文献は、参照により完全に提示されたかのようにその全体が本明細書に含まれる。特段の指示が無ければ、本発明の実施には、通常的な化学、分子生物学、微生物学、遺伝子工学及び植物生物学の技術（前記は当業界の技術範囲内にある）が用いられるであろう。

当業者に公知の任意の適切な材料及び／又は方法を本発明の実施に用いることができるが、好ましい材料及び／又は方法が開示される。以下の説明及び例示で参照される材料、試薬などは特段の指示がなければ市販の供給源から入手できる。

以下の用語の定義は全て本出願の全内容に適用される。“含む（comprising）”という用語は他の成分又は工程を排除せず、さらに不定冠詞“a”又は“an”は複数を排除しない。単一の工程が特許請求の範囲に列挙したいくつかの特徴を有する機能を満たすことができる。属性又は値に関する“本質的に”、“約”、“およそ”などの用語もまた、当該属性又は当該値をそれぞれ厳密に規定する。ある数値又は範囲の関係で“約”という用語は、当該ある値又は範囲の20%以内、10%以内又は5%以内の値又は範囲を指す。

【0039】

本明細書で用いられる“植物”は、任意の植物であってそのライフサイクル又は発育の任意の段階にあるもの、及びその子孫を指す。

本明細書で用いられる“植物部分”又は“植物の部分”は、栽培下又は培養下の植物の任意の部分、すなわち植物器官、植物組織、植物細胞、胚、葉などを指すことが意図され

る。高圧若しくは低圧又は前記の組合せ下での植物接種に関連する本発明のある種の実施態様では、この用語は栽培下の植物部分を指す。

本発明で用いられる“タバコの植物”は、ニコチアナ属に属する種の植物（ニコチアナ・タバクム（又はN.タバクム）を含むがただしこれらに限定されない）を指す。本発明のある種の実施態様は、ニコチアナ・タバクムと特定しないで“タバコの植物”という用語を用いて記載されるが、そのような記載は、特にニコチアナ・タバクムを含むと解されるべきである。

本発明で用いられる“植物細胞”又は“タバコの植物細胞”は、植物（特にタバコの植物）の構造的及び生理学的単位を指す。植物細胞は、細胞壁をもたないプロトプラスト、単離された単一細胞又は培養細胞の形態であるか、又はより高度な組織化された単位（例えば植物組織、植物器官又は全植物であるが、ただしこれらに限定されない）として存在し得る。

【0040】

本発明で用いられる“植物材料”は、植物から入手できる任意の固体、液体若しくは気体状組成物又は前記の組合せを指し、葉、茎、根、花又は花の部分、果実、花粉、卵細胞、接合子、種子、挿穂、分泌物、細胞若しくは組織培養、又は植物の任意の他の部分若しくは生成物が含まれる。

本明細書で用いられる“植物組織”は、構造的又は機能的単位として組織化された植物細胞群を意味する。栽培下又は培養下の植物の任意の組織が含まれる。この用語は、全植物、植物器官、及び種子を含むが、ただし前記に限定されない。

本明細書で用いられる“植物器官”は、植物の別個の又は弁別的な部分、例えば根、茎、葉、花芽又は胚に関する。

“光学密度”又は“OD”という用語は、分光計で測定される、ある波長（例えば600nm＝OD₆₀₀）での光学成分の吸収の光学的測定に関する。

【0041】

“ポリヌクレオチド”という用語はヌクレオチドポリマーを指すために用いられ、前記ヌクレオチドポリマーは非改変若しくは改変デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）であり得る。したがって、ポリヌクレオチドはゲノムDNA、相補性DNA（cDNA）、mRNA又はアンチセンスRNAであり得るが、ただしこれらに限定されない。さらにまた、ポリヌクレオチドは、一本鎖若しくは二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるDNA、DNA及びRNAを含むハイブリッド分子、又は一本鎖及び二本鎖領域の混合物を含むハイブリッド分子であり得る。さらにまた、ポリヌクレオチドはRNA、DNA又はその両方を含む三本鎖領域を含むことができる。ポリヌクレオチドは、1つ以上の改変塩基（例えばホスホチオエート）を含むことができ、さらにペプチド核酸（PNA）でもよい。一般的に、本発明によって提供されるポリヌクレオチドは、cDNA、ゲノムDNA、オリゴヌクレオチドの単離若しくはクローニングフラグメント、又は個々のヌクレオチド、又は前記の組合せからアッセムブリングされてもよい。

【0042】

本明細書で用いられる“遺伝子配列”という用語は、タンパク質又はポリペプチド、特に異種タンパク質若しくはポリペプチド又は生物学的に活性なRNAをコードする核酸分子又はポリペプチドのヌクレオチド配列を指し、異種タンパク質のフラグメントのみをコードする部分的コード配列のヌクレオチド配列を包含する。遺伝子配列はまた、遺伝子の発現に対して調節機能を有する配列を含むことができ、前記は、遺伝子のイントロン配列と同様にコード配列に対して上流又は下流に位置する。

“転写調節ヌクレオチド配列”又は“調節性配列”という用語は各々、転写、RNAのプロセッシング若しくは安定性、又は関連する（又は機能的に連結された）転写されるべきヌクレオチド配列の翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を指す。転写調節ヌクレオチド配列は、転写されるべきヌクレオチド配列に対して多様な位置を占めることができる。転写調節ヌクレオチド配列は、転写されるべき配列（例えばコード配列）の上流（5'非コード配列）に、前記の内部に、又は前記の下流（3'非コード配列）に位置することができる

。転写調節ヌクレオチド配列は、エンハンサー、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、5'非翻訳配列、3'非翻訳配列、及びポリアデニル化シグナル配列を含む群から選択できる。それらは、天然及び合成配列、並びに合成及び天然配列の組合せである配列を含む。

【0043】

“プロモーター”という用語は遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列を指し、前記は遺伝子の転写開始を指令する。一般的には、プロモーター配列は必要であるが、前記が作動できるように連結されている遺伝子の発現を駆動させるために常に十分であるとは限らない。発現性遺伝子構築物の設計では、遺伝子の発現をプロモーターが制御できるように、遺伝子はプロモーターに十分に近接してかつプロモーターに対して適切な向きで配置される。プロモーターは、好ましくは遺伝子の上流で、転写開始部位からプロモーターまでの距離が、当該プロモーターがその天然のセッティングで制御する遺伝子と当該プロモーターまでの距離に近似する位置に配置される。当業界で公知のように、この距離のある程度の多様性はプロモーターの機能を損なうことなく容認され得る。本明細書で用いられるように、“作動できるように連結する”という用語は、あるコード領域の転写があるプロモーターによって制御及び調節される態様で、当該プロモーターが当該コード領域に接続されることを意味する。プロモーターをコード領域に作動できるように連結する手段は当業界では周知である。

10

【0044】

本発明の関係で用いられる“遺伝子サイレンシングのサプレッサー”という用語は、サイレンシングRNAと結合することによって、ある種のウイルスが転写後遺伝子サイレンシングを回避することを可能にするウイルスコード蛋白質を指す。植物細胞に導入されたとき、トランスジーンもまた、そのような遺伝子の低発現また無発現が確立される結果として転写後遺伝子サイレンシングを誘発することができる。

20

本明細書で用いられる“タンパク質”、“ポリペプチド”、“ペプチド”又は“ペプチドフラグメント”という用語は相互に用いられ、ペプチド結合によって連結される2つ以上のアミノ酸を含む生物分子を意味し、前記は折り畳まれて二次、三次又は四次構造を形成して特定の形態を獲得することができる。

本明細書で用いられる“異種”という用語は、細胞又は生物で固有のポリヌクレオチド又はポリペプチドとして天然に存在しない生物学的配列を指す。本明細書で用いられる、“組換えタンパク質”又は“異種タンパク質”又は“異種ポリペプチド”は、細胞によって生成されるが当該細胞には天然に存在しないタンパク質又はポリペプチドを指す。例えば、植物細胞又は全植物で生成される組換え体又は異種タンパク質は哺乳動物又はヒトのタンパク質であり得る。

30

【0045】

改変植物細胞で発現され得る異種タンパク質は、ワクチンで使用する抗原（病原体のタンパク質、ウイルス蛋白質、細菌タンパク質、原生動物タンパク質、線形動物タンパク質を含むが、ただしこれらに限定されない）、酵素（ヒトの疾患の治療に用いられる酵素、工業的に使用される酵素を含むが、ただしこれらに限定されない）、サイトカイン、サイトカインレセプターのフラグメント、血液タンパク質、ホルモン、ホルモンレセプターのフラグメント、リポタンパク質、抗体又は抗体フラグメントであり得る。

40

“抗体”という用語は、モノクローナル抗体、マルチ特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、単鎖Fvs (scFv)、単鎖抗体、一ドメイン抗体、ドメイン抗体 (VH、VHH、VLA)、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド結合Fvs (sdFv)、及び上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを指す。

特に、抗体には免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち抗原結合部位を含む分子が含まれる。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ（例えばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスであり得る。

本発明の文脈で“発現性”という用語は、葉の内部に含まれる植物細胞である遺伝子に

50

よってコードされるタンパク質又はポリペプチドの発現を指令する調節性エレメントと当該遺伝子との作動性結合を指す。

【0046】

本明細書で互換的に用いられる“壊死”及び“壊死性応答”という用語は、植物（特にタバコ植物）の組織における高感受性応答を指し、前記は例えば植物組織の例えばアグロバクテリウム株の接種によって誘発される。結果として、極めて低い標的組織の生存率が生じる。壊死は、注射された葉の組織が壊れ細胞が死んだときに観察される（以下を参照されたい：Klement & Goodman, Annual Review of Phytopathology 5 (1967) 17-44）。当業者は壊死と黄変を区別することができる（黄変には葉の組織の破壊及び広範な細胞死は存在しない）。

10

本明細書で用いられる、“T-DNA境界”は、アグロバクテリウム株（例えばA. ツメファシエンス又はA. リゾゲネス株）のビルレンス遺伝子の生成物又はその改変若しくは変異型によって認識され得る約25ヌクレオチド長の配列を含むDNAフラグメントを指し、さらにこのフラグメントは、それが結合しているDNA配列を真核細胞（好ましくは植物細胞）に移転させるために十分である。この定義には、全ての天然に存在する野生型Tiプラスミド由来T-DNA境界がその任意の機能的誘導体とともに含まれ（ただし前記に限定されない）、さらに化学的に合成されたT-DNA境界も含まれる。ある特徴では、本発明の発現構築物のコード配列及び発現制御配列は、2つのT-DNA境界の間に位置する。

【0047】

2つ以上のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の関係で“%同一性”又は“配列同一性”という用語は、最大一致を求めて比較及びアラインメントを実施し以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いて又は目視精査によって測定したとき、同じであるか又は所定のパーセンテージのアミノ酸残基又はヌクレオチドが同じものである2つ以上の配列又は部分配列を指す。

20

互いに比較されるべき2つの配列の長さが異なる場合、配列同一性は、好ましくは長い方の配列のヌクレオチド残基と同一である短い方の配列のヌクレオチド残基のパーセンテージに関する。本明細書で用いられるように、2つの配列間の%同一性は、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮した、当該配列によって共有される同一位置の数の関数である（すなわち%同一性＝同一位置の数／位置の総数×100）である。2つの配列間の配列比較及び%同一性の決定は、下記に記載するように数学的アルゴリズムを用いて達成できる。例えば、配列同一性は、コンピュータープログラム、例えばBestfitプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Unix（登録商標））；Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711）を使用して通常的に決定できる。Bestfitは、2つの配列間で最高の配列同一性を有する断片を見出すために、SmithとWaterman（Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489）の局所相同性アルゴリズムを利用する。特定の配列が本発明の参照配列と例えば95%の配列同一性を有するか否かを決定するために、Bestfit又は別の配列アラインメントプログラムを用いるとき、パラメーターは、好ましくは、同一性パーセンテージが参照配列の全長にわたって計算されるように、さらに参照配列中のヌクレオチドの総数の5%までの相同性ギャップが許容されるように調整される。Bestfitを用いるとき、いわゆるオプションパラメータは、好ましくはそれらの初期値（“規定値”）に据え置かれる。与えられた配列と上記の本発明の配列との比較で出現する逸脱は、例えば付加、欠失、置換、挿入又は組換えによって生じ得る。そのような配列比較は、好ましくはまたプログラム“fasta20u66”（バージョン2.0u66；William R. Pearson and the University of Virginia (1998年9月)；以下もまた参照されたい：W.R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98）を用いて実施できる。この目的のために、“規定値”パラメーター設定を用いることができる。また別には、2つの配列のパーセンテージ同一性は、EMBOSSニードルコンピュータプログラム（Rice et al. (2000) Trends in Genetics 16:276-277）を用いて配列情報を比較することによって決定することもできる。EMBOSSニードルは、2つのインプット配列を読み取り、それ

30

40

50

らの至適な全体の配列アラインメントをファイルに書き込む。EMBOSSニードルは、2つの配列の全長にわたって最適なアラインメント（ギャップを含む）を見つけるために、Needleman-Wunschアラインメントアルゴリズム（Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453）を利用する。同一性の値は、書き込まれたアラインメント領域（その長さの中に存在する一切のギャップを含む）にわたって2つの配列間に存在する同一マッチのパーセンテージである。

【0048】

配列比較によって比較される2つのヌクレオチドの長さが異なる場合、同一性は短い方の配列及び短い方の配列にマッチする長い方の配列の当該部分を指す。換言すれば、比較される配列が同じ長さをもたないとき、同一性の程度は、好ましくは長い方の配列中のヌクレオチド残基と同一である短い方の配列中のヌクレオチド残基のパーセンテージを指すか、又は短い方の配列中のヌクレオチド配列と同一である長い方の配列中のヌクレオチドのパーセンテージを指す。この関係では、当業者は、短い方の配列と“マッチする”長い方の配列の当該部分を容易に決定することができる。例えば、配列番号：1に示すポリヌクレオチドと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるヌクレオチド又はアミノ酸配列は、これら配列の対立遺伝子、誘導体又は変種（好ましくは類似の生物学的機能を有する）であり得る。それらは、天然に存在する変種（例えば対立遺伝子変種、他の生態型、品種、種などに由来する配列）又は変異種であり得る。前記変異は天然に生じたか、又は意図的な変異導入方法（例えば本発明で開示した方法）によって生成されたものであり得る。さらにまた、変種は合成によって生成された配列でもよい。対立遺伝子変種は、天然に存在する変種又は合成により生成された変種又は組換えDNA技術によって生成された変種であり得る。上記に記載のポリヌクレオチドからの逸脱は、例えば欠失、置換、付加、挿入又は組換え、又は挿入と組換えによって生成されたものであり得る。“付加”という用語は、ある配列の末端へ少なくとも1つの核酸残基又はアミノ酸を付加することを指し、一方、“挿入”は、ある配列内への少なくとも1つの核酸残基又はアミノ酸の挿入を指す。

【0049】

プロモーター/エンハンサー/ターミネーター

先行する実施態様のいずれか1つに対応する本発明の最小二元性ベクターは、所望の場合は、プロモーター調節領域（例えば、誘導性若しくは構成性発現、環境により若しくは発育により調節される発現、又は細胞特異的若しくは組織特異的発現を付与する領域）、転写開始スタート部位、リボソーム結合部位、RNAプロセッシングシグナル、転写終了部位、及び／又はポリアデニル化シグナルを含むことができる。本発明の方法で用いられる調節性エレメントは、発現カセットの部分であり、対象タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動できるように連結されてベクター分子、特に二元性ベクター分子（ただし特に本明細書に記載の最小サイズの二元性ベクター）中に存在し得る。

本発明の多様な実施態様では、前記調節性エレメントは、本明細書に記載の先行する実施態様のいずれか1つに対応する最小サイズの二元性ベクターのT-DNA領域に存在する。

先行する実施態様のいずれか1つに対応する最小サイズの二元性ベクターで使用される好ましいプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、改変カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス235Sプロモーター、最小35Sプロモーター、ノパリンシンターゼプロモーター、ササゲモザイクウイルスプロモーター、HT-CPMVプロモーター、タバココパリルシンターゼCPS2pプロモーター、ジヒドリニンプロモーター、プラスチアニンプロモーター、35S/HT-CPMVプロモーター、及びカウリモウイルス科に属するDNAウイルスから誘導される多くの他のプロモーター（完全長転写（Flt）プロモーター又はサブゲノム転写プロモーターであり、そのようなDNAウイルスの例には、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、ミラビリスモザイクウイルス（MMV）、フィグワートモザイクウイルス（FMV）、落花生白線ウイルス（PCLSV）が含まれるが、ただしこれらに限定されない）である。先行する実施態様のいずれか1つに対

応する最小サイズの二元性ベクターで使用される特に好ましいものは、カウリモウイルス科に属するDNAウイルスの完全長転写 (Flt) プロモーターである。前記には例えば以下が含まれるが、ただしこれらに限定されない：FMVプロモーター（例えばW01998000534及びUS5994521に記載されたもの）、MMVプロモーター（例えばUS6420547及びUS6930182に記載されたもの）、及びPCISVプロモーター（例えばW01998005198、US5850019及びEP929211に記載されたもの）。多くのそのようなプロモーターは、そのプロモーター活性を強化するために、そのエンハンサー配列の複数コピー（例えば2コピー）を縦並びに連結することによって（例えば二CaMV35Sプロモーター（35Sx2）、二MMVプロモーター（MMVx2）、二FMVプロモーター（FMVx2）（ただしこれらに限定されない））改変することができる。公知の又は引用文献に記載されているこれらのプロモーターの機能的フラグメントを本発明のベクターで用いることができる。そのようなプロモーターの具体例を作製し、本発明の最小ベクターでのクローニングを容易にするためにEcoRI及びHindIII制限酵素切断部位をその末端に加えた。これらの配列と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であり、さらに作動できるように連結されてあるヌクレオチド配列の植物での発現を可能にする機能を有するヌクレオチド配列もまた本発明のベクターで使用することができる。

【0050】

本発明の具体的な実施態様では、1つ以上の以下のプロモーター配列を、本発明に対応し先行するパラグラフのいずれか1つに記載したベクターにおいて用いることができる：

EcoRIとHind3との間で一強化されるpMMV

gaattcgtcaacttcgtccacagacatcaacatcttatcgctcctttgaagataagataataatggtgaagataagagtgggagccaccactaaaacattgctttgtcaaaagctaaaaaagatgatgcccgacagccacttgtgtgaagcatgagaagccggtccctccactaagaaaattagtgagcatcttccagtgggtccctccactcacagctcaatcagtgagcaacaggacgaaggaaatgacgtaagccatgacgtctaattcccacaagaatttccttatataaggaacacaaaatcagaaggaagagatcaatcgaaatcaaaatcggaatcgaaatctctcatctaagctt（配列番号：25）

EcoRIとHind3との間で二強化されるpMMV

gaattcgtcaacttcgtccacagacatcaacatcttatcgctcctttgaagataagataataatggtgaagataagagtgggagcccccactaaaacattgctttgtcaaaagctaaaaaagatgatgcccgacagccacttgtgtgaagcatgagaagccggtccctccactaagaaaattagtgagcatcttccagtgggtccctccactcacagctcaatcagtgagcaacaggacgaaggaaatgacgtaagccatgacgtctaattcccacaagaatttccttatataaggaacacaaatcagaaggaagagatcaatcgaaatcaaaatcggaatcgaaatctctcatctaagctt（配列番号：26）

EcoRIとHind3との間で一強化されるpFMV

gaattcgtcaacatcgagcagctggcttgtggggaccagacaaaaaaggaatggtgcagaattgttaggcgcacctaccaaaagcatctttgcctttattgcaaagataaagcagattcctctagtacaagtggggaacaaaataacgtggaaaagagctgtcctgacagcccactcactaatgcgtatgacgaacgcagtgacgaccacaaaagattgcccgggtaattccctctatataagaaggcattcattcccatttgaaggatcatcagatactcaaccaatatttctcactctaagaaattaagagctttgtattcttcaatgagggctaagacccaagctt（配列番号：27）

EcoRIとHind3との間で二強化されるpFMV

gaattcgtcaacatcgagcagctggcttgtggggaccagacaaaaaaggaatggtgcagaattgttaggcgcacctaccaaaagcatctttgcctttattgcaaagataaagcagattcctctagtacaagtggggaacaaaataacgtggaaaagagctgtcctgacagcccactcactaatgcgtatgacgaacgcagtgacgaccacaaaagattgcccacatcgagcagctggcttgtggggaccagacaaaaaaggaatggtgcagaattgttaggcgcacctaccaaaagcatctttgcctttattgcaaagataaagcagattcctctagtacaagtggggaacaaaataacgtggaaaagagctgtcctgacagcccactcactaatgcgtatgacgaacgcagtgacgaccacaaaagattgcccgggtaattccctctatataagaaggcattcattcccatttgaaggatcatcagatactcaaccaatatttctcactctaagaaattaagagctttgtattcttcaatgagaggctaagacccaagctt（配列番号：28）

EcoRIとHind3との間で一強化されるpPCISV

gaattcaattcgtcaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgatgtgacctaaagcaataatggagccatgacgta
agggttacgccatacgaataattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacctttactttttatatttggcg
tgtatttttaaatttccacggcaatgacgatgtgacctgtgcatccgctttgcctataaataagtttttagtttgtattga
tcgacacgatcgagaagacacggccataaagctt (配列番号：29)

EcoRIとHind3との間で二強化されるpPCISV

gaattcgtcaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgatgtgacctaaagcaataatggagccatgacgtaagggc
ttacgccatacgaataattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacctttactttttatgtttggcgtgtat
ttttaatttccacggcaatgacgatgtgacccaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgatgtgacctaaagca
ataatggagccatgacgtaagggttacgccatacgaataattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacct
ttactttttatatttggcgtgtatttttaaatttccacggcaatgacgatgtgacctgtgcatccgctttgcctataaat
aagtttttagtttgtatttgatcgacacggctcgagaagacacggccataaagctt (配列番号：30)

【0051】

カウリモウイルス科のこれらDNAウイルスの1つに由来するFLtプロモーターをT-DNA領域
に挿入することによって、2シリーズのpC100誘導ベクターを作製した。図7は、9ベクター
（すなわちpC141、pC190、pC191、pC192、pC193、pC241、pC242、pC243及びpC265）のシ
リーズのT-DNA領域を示す。これらベクターのFLtプロモーターの下流に存在するマルチク
ローニング部位は、植物細胞、特にニコチアナ属の植物（特にニコチアナ・タバタム）の
植物細胞で発現させるために対象ヌクレオチド配列の挿入を可能にする。より小さいベク
ターである第二のシリーズは、植物選別性マーカー（nptII）をコードするヌクレオチド
配列を含む発現カセットを除去することによって作製された。前記除去は、第一のシリ
ーズのベクターの各々をSpeI及びAvrIIで消化し、プラスミドを再び環状化させることによ
って実施された。これらのベクター（すなわちpC277、pC278、pC279、pC280、pC281及びp
C282）は、植物細胞又は植物、特にニコチアナ属の植物（特にニコチアナ・タバタム）で
対象ポリペプチドを一過性に発現させるために特に適切である。したがって、本明細書の
先行する実施態様のいずれか1つに記載する本発明の二元性ベクターは、MMV、FMV又はPCI
SVのDNAウイルス由来のFLtプロモーター（例えば配列番号：25、配列番号：26、配列番号
：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30）の1つ又は2つ又は3つ以上及び場合
によって植物選別性マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む発現カセットをそのT-
DNA領域に含むことができる。ある実施態様では、本明細書の先行する実施態様のいづれ
か1つに記載する本発明の最小サイズの二元性ベクターは、ササゲモザイクウイルスから
誘導される1つ以上の調節性配列を含むことができる（HT-CPMV；W007/135480（前記文献
は参照により本明細書に含まれる））。好ましくは、二元性ベクターはまた最小35S CaMV
プロモーターを含む。HT-CPMV系は、最小プロモーター、改変5'-UTR（高翻訳性エレメン
トを含む）及びCPMV RNA-2由来3'-UTRを土台にし、前記は植物での翻訳強化及び組換えタン
パク質の高蓄積を可能にする。

【0052】

最小35-CaMVプロモーター

gaaacctctcgattccattgccagctatctgtcactttattgagaagatagtggaaggaaggtggctcctacaaa
tgccatcattgcgataaaggaaaggccatcggtgaagatgcctctgccgacagtgggtccaaagatggacccccaccac
gaggagcatcggtgaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggattgatgtgatattctccactgacgtaa
gggatgacgcacaatcccactatccttcgcaagacccttctctatataaggaagttcatttcatattggagagg (配列
番号：20)

5'-UTR HT-CPMV

tattaaaatcttaataggttttgataaaagcgaacgtggggaaacccgaaccaaaccttcttctaaactctctctcatct
ctcttaaagcaaaccttctctctgtctttcttgcgtgagcgatcttcaacgttgtcagatcggtctcgccaccagtaca
acgttttctttcactgaagcgaatacaaagatctcttggtagacgtagtgccgagccattaaataacgtgtacttgtc
ctattcttgcgtgtgtgtcttgggaaaagaaagcttgcgtggagctgctgttcagccccatacattacttgttacgatt
ctgctgacttctcgcggtgcaatatctctacttctgcttgacgaggtattgttgctgtacttcttcttcttcttctt
gctgattgggtctataagaaatctagtatttcttgaacagagtttcccgtggttttcgaacttgagaaagattgt

taagcttctgtatatattctgcccaatttgtcgggccc (配列番号：21)

3'-UTR HT-CPMV

attttctttagtttgaatttactgttattcgggtgtgcatttctatgtttggtagcggttttctgtgtcagagtgtgtt
tattttatgtaatttaatttctttgtgagctcctgttttagcaggctcgctcccttcagcaaggacacaaaaagattttaatt
ttattaaaaaagaccggg (配列番号：22)

【0053】

プロモーター配列は基部エレメント及びより遠位の上流エレメントから成ることがあり、後者のエレメントはしばしばエンハンサーと称される。したがって、“エンハンサー”はプロモーター活性を刺激することができるDNA配列であり、当該プロモーターの固有配列、又はプロモーターのレベル若しくは組織特異性を強化するために挿入される異種エレメントであり得る。前記は両方（正常又は反転）の向きで作動することができ、プロモーターの上流又は下流に移動したときでさえ機能することができる。エンハンサー及び他の上流のプロモーターエレメントの両方が、前記の作用を媒介する配列特異的DNA結合タンパク質と結合する。プロモーターは、本来の遺伝子からその全体が誘導されても、又は種々のエレメントで構成されても、天然に見出される種々のプロモーターから誘導されても、又は合成DNA断片で構成されてもよい。プロモーターはまた、生理学的状態又は発育状態に応答して転写開始効率を制御するタンパク質因子の結合に必要なDNA配列を含むことができる。

エンハンサーの例には以下に由来するエレメントが含まれる：CaMV 35Sプロモーター、オクトピンシンターゼ遺伝子 (Ellis et al., 1987)、イネアクチンI遺伝子、トウモロコシアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (Callis 1987)、トウモロコシシュリンクI遺伝子 (Vasil 1989)、タバコエッチウイルス (TEV) 及びタバコモザイクウイルス (TMV) オメガ翻訳エンハンサー (Gallie 1989) 及び非植物真核細胞由来プロモーター（例えば酵母；Ma 1988）。本発明にしたがって使用されるベクターは、そのようなエンハンサーエレメントを含むように構築することができる。1つのエレメント、特に複数コピーのエレメントの使用は、植物の形質転換の関係で適用されるとき、隣接プロモーターからの転写レベルを高めるために作用することができる。

ターミネーション領域は、ノパリンシンターゼ (nos)、栄養性貯蔵タンパク質 (vsp) 又はプロテイナーゼ阻害因子2 (pin2) ターミネーション領域から成る群から選択できる。

【0054】

シグナルペプチド

先行する実施態様のいずれか1つに記載の最小二元性ベクターはさらに、新しく発現されたタンパク質を細胞内の位置に誘導するシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。そのようなベクター分子内で用いることができるシグナルペプチドは、例えば、空胞ターゲティング配列、葉緑体ターゲティング配列、ミトコンドリアターゲティング配列、植物細胞でタンパク質小体の形成を誘導する配列、又は植物細胞で油滴の形成を誘導する配列から成る群から選択されるものである。

本発明のある実施態様では、ターゲティング配列は、タンパク質を小胞体に移入するためのシグナルペプチドである。シグナルペプチドは、タンパク質の最N-末端に位置し、翻訳と同時に小胞体膜の貫通移転中に切断される輸送ペプチドである。本発明のベクター分子で用いることができるシグナルペプチドは、IgGの軽鎖若しくは重鎖配列のN-末端に天然に存在するもの、又はEP2002807566及びWO2007EP1606に記載されたパタチンシグナルペプチド、特に実施例3に記載するpC148のパタチンシグナルペプチドであるが、ただしこれらに限定されない。パタチンシグナルペプチド配列をコードすることができる任意のヌクレオチド配列を用いることができる。

【0055】

ある実施態様では、パタチンシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を、本発明に対応し先行する実施態様のいずれか1つに記載されているベクター内で用いることができる。ここで前記パタチンシグナルペプチドは、MATTKSFLILFFMILATTSSTCA (配列番号

: 31) から成る。

さらに別のシグナルペプチドは、例えばSignalP予測ツール (Emanuelsson et al., 2007, Nature Protocols 2: 953-971) によって予測することができる。

本発明の別の実施態様では、ターゲティング配列は小胞体残留ペプチドであり得る。小胞体残留ターゲティング配列は、タンパク質の最C-末端に存在し、4アミノ酸配列 (例えばKDEL、HDEL又はDDE、式中、Kはリジン、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Lはロイシン、Hはヒスチジンである) であり得る。

本発明のさらにまた別の実施態様では、ターゲティング配列は、タンパク質と融合させたとき、小胞体中で非分泌性貯蔵細胞小器官の形成をもたらす配列であり得る。前記は、例えばW007/096192、W006/056483及びW006/056484に記載されたものであるが、ただしこれらに限定されない。

10

本発明のある種の実施態様では、ターゲティング配列は空胞ターゲティング配列、葉緑体ターゲティング配列、ミトコンドリアターゲティング配列、又は任意の他の配列であってその付加が前記任意の配列に融合されたタンパク質の、植物又は植物細胞中の特定の細胞小器官への特異的ターゲティングを生じるものであり得る。

【0056】

ある実施態様では、本発明に対応しさらに先行する実施態様のいずれか1つに規定されるベクター分子はさらに、部位特異的組換えのためにT-DNA領域内に部位特異的組換え部位を含む。

ある実施態様では、部位特異的組換え部位は植物調節性エレメントの下流に位置する。別の実施態様では、部位特異的組換え部位は植物調節性エレメントの上流に位置する。

20

本発明の具体的な実施態様では、組換え部位は、LoxP部位及びCre-Lox部位特異的組換え系の部分である。

Cre-Lox部位特異的組換え系は、環状リコンビナーゼ (Cre) を利用する (Creは、Creに特異的な結合部位を含む固有部位 (LoxP) 間の組換えを触媒する)。

別の具体的な実施態様では、組換え部位はゲートウェイデスティネーション部位である。例えば、対象核酸は第一に市販の“エントリーベクター”でクローニングされ、続いて“デスティネーションベクター”で組換えが生じる。デスティネーションベクターは、ある核酸配列又は多数の配列のプロモーター活性の分析、機能の分析、タンパク質の位置決定に、タンパク質-タンパク質相互作用の分析に、ある遺伝子のサイレンシングに、又はアフィニティー精製実験に用いることができる。

30

【0057】

遺伝子サイレンシングのサプレッサー

多様な実施態様では、先行する実施態様のいずれか1つに記載の最小二元性ベクターはさらに、遺伝子サイレンシングのサプレッサー、特にウイルス起源の遺伝子サイレンシングサプレッサー、及び特にポティウイルス又は以下から成る群から選択されるウイルス (キュウリ壊死ウイルス (CNV)、ハーベルリバーウイルス (HaRV)、ナシ潜伏ウイルス (PeLV)、リシアンタス壊死ウイルス、ブドウアルジェリア潜伏ウイルス、ペラルゴニウム壊死斑ウイルス (PeNSV)、シンビジウムリングスポットウイルス (CymRSV)、アーティチョークモットルクリンクルウイルス (AMCV)、カーネーションイタリアンリングスポットウイルス (CIRV)、レタス壊死萎縮病ウイルス、イネ黄斑ウイルス (RYMV)、ジャガイモXウイルス (PVX)、ジャガイモYウイルス (PVY)、アフリカキャッサバモザイクウイルス (ACMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、タバコエッチウイルス (TEV) 又はトマトブッシースタントウイルス (TBSV)) の遺伝子サイレンシングのサプレッサーを含むことができる。

40

別の実施態様では、遺伝子サイレンシングのサプレッサーは、キュウリ壊死ウイルス (CNV) のp19タンパク質、イネ黄斑ウイルス (RYMV) のp1タンパク質、ジャガイモXウイルス (PVX) のp25タンパク質、アフリカキャッサバモザイクウイルス (ACMV) のAC2タンパク質、キュウリモザイクウイルス (CMV) の2bタンパク質、タバコエッチウイルス (TEV) のヘルパー成分プロテイナーゼ (HcPro) から成る群から選択される。

50

HcProを含む遺伝子サイレンシングのサプレッサーの詳細な記述はW098/44097、WO 01/38512及びW001/34822に提供される（前記文献は参照によりその全体が本明細書に含まれる）。HcPro（本明細書ではP1-HcPro-P3（配列番号：23）と称される）をコードする例示的ヌクレオチド配列は、当業界で公知の二元性ベクター又は本発明の最小サイズの二元性ベクターに挿入できる。したがって、非限定的な例では、発現性HcPro遺伝子配列は、配列番号：23又はタバコ植物で異種タンパク質の収量増強の機能を有するそのフラグメントを含む。

【0058】

異種タンパク質

先行する実施態様のいずれか1つに記載の最小二元性ベクターはさらに、タンパク質又はポリペプチド、特に、成長因子、レセプター、リガンド、シグナリング分子、キナーゼ、酵素、ホルモン、腫瘍サプレッサー、血液凝固タンパク質、細胞周期タンパク質、代謝タンパク質、神経タンパク質、心臓タンパク質、特定の症状で不足するタンパク質、抗体、抗原、疾病に対する耐性を提供するタンパク質、抗菌性タンパク質、インターフェロン及びサイトカインから成る群から選択される異種タンパク質又はポリペプチドをコードする、発現性ヌクレオチド配列を含むことができる。前記発現性ヌクレオチド配列は、植物細胞、特にニコチアナ属（特にニコチアナ・タバカム）の植物の植物細胞で発現させるために最適化されてある配列を含むことができる。前記発現性ヌクレオチド配列は本来のヒトコード配列とは異なることがあるが、翻訳生成物のアミノ酸は同一である。前記発現性ヌクレオチド配列の1つ以上のコドン、植物（特にニコチアナ属（特にニコチアナ・タバカム）の植物）の公知のコドン使用頻度にしたがって優先コドンに置き換えられてあり、その結果、植物又はタバコ植物で（本来のコード配列を用いる場合と比較して）発現増加を可能にする、前記発現性ヌクレオチド配列内で同じアミノ酸をコードする優先コドンパターンを生じる。そのような目的のためにヌクレオチド配列を改変する技術は周知であり、例えばUS 5,786,464及びUS 6,114,148を参照されたい。

【0059】

ある特徴では、先行する実施態様のいずれか1つに記載の二元性ベクターは、防御免疫応答を誘発するための配列を含む抗原コード配列を含むことができる（例えばワクチン処方物におけるように）。適切なそのような抗原には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：微生物性抗原（ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、寄生虫抗原など）；多細胞生物（例えば多細胞性寄生虫）の抗原；アレルゲン；及びヒト又は動物病理学に関係する抗原（例えば癌、自己免疫など）。ある好ましい特徴では、ウイルス抗原には、HIV抗原；インフルエンザに対して防御免疫応答を付与する抗原；ロタウイルス抗原、炭疽抗原；狂犬病抗原などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。ワクチン抗原は多価ペプチド又はポリペプチドとしてコードされ得る（例えば、前記ペプチド又はポリペプチドは、発現構築物中で、異なる又は同じ抗原コード配列（場合によって1つ以上のリンカー配列によって分離されてある）を含むことができる）。

ある実施態様では、発現性ヌクレオチド配列は、抗体の軽鎖、抗体の重鎖、又は抗体の軽鎖及び重鎖の両方をコードする。具体的な実施態様では、軽鎖又は重鎖は、ヒトCD20と結合する抗体の軽鎖又は重鎖である。別の具体的な実施態様では、重鎖又は軽鎖は、リツキシマブの抗体結合部位によりヒトCD20と結合する抗体の重鎖又は軽鎖である。

【0060】

多様な実施態様では、発現性ヌクレオチド配列は、インフルエンザウイルス抗原（特にヘマグルチニン（HA））から成る群から選択される異種タンパク質又はポリペプチドをコードする。インフルエンザウイルスは、感染した哺乳動物細胞の形質膜から発芽するエンベロープを有するウイルスである。それらは、存在する核タンパク質及びマトリックスタンパク質抗原を基準にしてA、B又はC型に分類される。A型インフルエンザウイルスはさらに、提示されるヘマグルチニン（HA）及びノイラミニダーゼ（NA）表面糖タンパク質の組合せにしたがって15のサブタイプに分割され得る。HAは、宿主細胞に結合及び侵入するウイルスの能力を決定する。

現在のところ16のHAサブタイプ（H1－H16）が認識されている。A型インフルエンザウイルスの各々は、HAの1つの型及びNA糖タンパク質の1つの型を提示する。本発明の方法によって製造できるHAタンパク質には、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15若しくはH16、又はそのフラグメント若しくは部分が含まれる。そのようなHAタンパク質を含むサブタイプの例には以下が含まれる：A/ニューカレドニア/20/99（H1N1）、A/インドネシア/512006（H5N1）、A/ニワトリ/ニューヨーク/1995、A/ハーリングガル(herring gull)/DE/677/88（H2N8）、A/テキサス/32/2003、A/マガモ/MN/33/00、A/アヒル/シャンハイ/1/2000、A/オナガガモ(northern pintail)/TX1828189/02、A/シチメンチョウ/オンタリオ/6118/68（H8N4）、A/ハシビロガモ/イラン/G54/03、A/ニワトリ/ドイツ/N/1949（H10N7）、A/アヒル/イギリス/56（H11N6）、A/アヒル/アルバータ/60176（H12N5）、A/カモメ/メリーランド/704/77（H13N6）、A/マガモ/グルジア/263/82、A/アヒル/オーストラリア/341/83（H15N8）、A/黒頭カモメ/スウェーデン/5/99（H16N3）、B/リー/40、C/ヨハネスブルグ/66、A/プエルトリコ/8/34（H1N1）、A/ブリスベン/59/2007（H1N1）、A/ソロモン諸島3/2006（H1N1）、A/ブリスベン10/2007（H3N2）、A/ウィスコンシン/67/2005（H3N2）、B/マレーシア/2506/2004、B/フロリダ/4/2006、A/シンガポール/1/57（H2N2）、A/Anhui/112005（H5N1）、A/ベトナム/1194/2004（H5N1）、A/コガモ/ホンコン/W312/97（H6N1）、A/ウマ/プラハ/56（H7N7）、A/ホンコン/1073/99（H9N2）。上記に記載のHサブタイプの1つを有するインフルエンザウイルスのいくつかはヒトでの感染を引き起こし、さらにその起源のために大流行を引き起こし得ると考えられる。これらサブタイプ（H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16）の抗原の多くは、したがって流行性インフルエンザワクチンで用いることができる。サブタイプH1、H2、H3は、ヒトインフルエンザ感染に中心的に関与する主要サブタイプであり、そのようなサブタイプの抗原が季節性インフルエンザワクチンで使用される。

【0061】

インフルエンザヘマグルチニン又はその免疫原性フラグメントをコードする任意のヌクレオチドを、宿主のN.タバコム品種で前記ヘマグルチニンポリペプチド又はそのフラグメントが製造されるように本発明の方法で用いることが意図される。例えば、以下の公開データベースで報告されたインフルエンザヘマグルチニンの生物学的配列のいずれかを本発明にしたがって用いることができる（Genbank (Nucleic Acids Research 2004 Jan 1;32(1):23-6)、インフルエンザリサーチデータベース（IRD）以下を参照されたい：www.fludb.org）又はSquires et al. BioHealthBase: informatics support in the elucidation of influenza virus host pathogen interactions and virulence. Nucleic Acids Research (2008) vol. 36 (Database issue) pp. D497）。

対象となる異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列の例は、配列番号：24に示すように下記で提供される。このヌクレオチド配列は成熟インフルエンザヘマグルチニン5（H5）をコードする。したがって、本発明は、上記に記載するように先行する実施態様のいずれか1つに記載のベクターを意図し、前記ベクターは、配列番号：24と少なくとも90%、92%、94%、96%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を示す、成熟インフルエンザヘマグルチニン5をコードするヌクレオチド配列を、T-DNA領域内に植物調節性エレメントに作動できるように連結されて含む。

【0062】

atggagaaaatagtgcttcttcttgcaatagtcagtccttgtaaaagtgatcagatttgcatgtggttacatgcaaac
aatcaacagagcaggttgacacaatcatggaaaagaacgttactgttacacatgcccaagacatactggaaaagacaca
caacgggaagctctgcgatctagatggagtgaagcctctaattttaagagattgtagttagctggatggctcctcgga
acccaatgtgtgacgaattcatcaatgtaccggaatggtcttacatagtggaaggccaatccaaccaatgacctctgt
taccaggaggatttcaacgactatgaagaactgaaacacctattgagcagaataaacattttgagaaaattcaaatcat
ccccaaaagtctcttggtccgatcatgaagcctcatcaggagttagctcagcatgtccataacctgggaagtcctcctttt
ttagaaatgtggtatggcttatcaaaaagaacagtacatacccaacaataaagaaaagctacaataataccaaccaagag
gatcttttggtactgtgggaattcaccatcctaattgatgcggcagagcagacaaggctatatcaaaacccaaccaccta
tatttccattgggacatcaacactaaaccagagattggtacaaaaatagctactagatccaaagtaaacgggcaaagtg

gaaggatggagttcttctggacaattttaaaacctaatgatgcaatcaacttcgagagtaatggaaatttcattgctcca
gaatatgcatacaaaattgtcaagaaaggggactcagcaattatgaaaagtgaattggaatatggtaactgcaacaccaa
gtgtcaaaactccaatggggcgataaaactctagtagtccatccacaacatacacccctctcaccatcggggaatgcccc
aatatgtgaaatcaaacagatttagtccttgcaacaggggtcagaaatagccctcaaagagagagcagaagaaaaagaga
ggactatttgagctatagcaggttttatagagggaggatggcaggggaatggtagatgggttggtatgggtaccaccatag
caatgagcaggggagtggttacgctgcagacaaagaatccactcaaaaggcaatagatggagtcaccaataaggtcaact
caatcattgacaaaatgaacactcagtttgaggccgttggaagggaatttaataacttagaaaggagaatagagaattta
aacaagaagatggaagacgggtttctagatgtctggacttataatgccgaacttctgggtctcatggaaaatgagagaac
tctagactttcatgactcaaatgttaagaacctctacgacaagggtccgactacagcttagggataatgcaaaggagctgg
gtaacgggtgttttcgagttctatcacaatgtgataatgaatgtatggaaagtataagaaacggaacgtacaactatccg
cagtattcagaagaagcaagattaaaaagagaggaaataagtggggtaaaattggaatcaataggaacttaccaatact
gtcaatttattcaacagtggcgagttccctagcactggcaatcatgatggctggtctatctttatggatgtgctccaatg
gatcggttacaatgcagaatttgcatttaa (配列番号：24)。

10

【0063】

前記構築物及び本発明のベクターの更なる詳細は以下の実施例で述べる（当該実施例は、本発明をさらに詳しく例示するが限定を意図するものではない）。

本発明のベクターは2つの部分を結合させることによって構築される。前記2つの部分の第一の部分は、細菌宿主細胞でのベクターの複製及び安定な維持に必要な構造的及び機能的なエレメントを含み、本明細書でベクター骨格又は骨格配列と称され、第二の部分は、対象核酸の宿主細胞へのデリバリーのための構造的エレメントを含み、本明細書ではトランスファー-DNA又はT-DNA領域と称される。植物細胞で発現させる核酸は、T-DNA領域（2つの直接的リピート配列（すなわちT-DNA右境界及びT-DNA左境界）によって境界が形成される）に添加される。

20

【0064】

そのようなベクターのT-DNAでのクローニング、特に複数の核酸の高処理クローニングのために、植物細胞のアグロバクテリウム媒介形質転換のためのベクターは、大腸菌宿主細胞だけでなくアグロバクテリウム亜種宿主細胞でも複製できることが望ましい。アグロバクテリウム亜種宿主細胞は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス又はアグロバクテリウム・リゾゲネス宿主細胞であり得る。そのようなベクターでの核酸のクローニングの効率及び容易さのために、そのようなベクターは最小のサイズを有し、さらに高コピープラスミドとして安定的に維持されることが有利である。植物細胞を形質転換する高コピーベクターは公知であるが、ただし相当にサイズが大きく（6000塩基対を超える）、植物の核ゲノムへのマルチ組み込み及び時に複雑な組み込みを生じる傾向がある。植物核ゲノムへのマルチ組み込み及び複雑な組み込みは、植物細胞に移転されるゲノムの転写後サイレンシングをもたらすので望ましくない。さらに、そのようなベクターはまた、タンパク質又は他の化合物を製造するそのような植物の認可についてUSDA及びFDAの規制障壁となるベクター骨格配列の組み込みをもたらす。

30

【0065】

実施例1に示すように、最小の骨格及びT-DNA領域を含む5,150塩基対未満の二元性ベクターが、大腸菌及びアグロバクテリウム亜種での複製及び安定な維持に影響を及ぼすことなく高コピープラスミドとして提供される。

40

実施例3及び4にそれぞれ示すように、最小二元性ベクターpPMP1（pPMP1の配列は表1に提供される）及びその誘導体の使用は、ニコチアナ・タバクム及びニコチアナ・ベンタミアナの形質転換植物細胞での核酸、タンパク質又はペプチドの発現と同様に安定的な発現をもたらした。さらにまた、pPMP1及びその誘導体（例えば最小植物選別性二元性ベクターpCP100）による形質転換は、好ましくは一コピー或いは低コピー数組み込みを実施例1で示すようにもたらし、実施例5に示すようにベクター骨格配列の組み込みはほとんど又は全く生じなかった。

したがって、本出願は、特に植物細胞で核酸の発現に有利な、特に植物細胞、植物組織又は植物細胞の特定の区画で対象タンパク質又はポリペプチドの発現に有利な、対象とな

50

る1つ以上の代謝物又は他の化合物の植物細胞又は植物細胞の部分での製造に有利な、植物細胞で調節性機能を有する配列の同定に有利な、遺伝子及び核酸機能の同定、対象となる1つ以上の外因性又は内因性核酸の同定のために有利な、アグロバクテリウム媒介形質転換用ベクターを提供する。

これらのベクターは、最小サイズを有し、細菌細胞で高コピー数として安定的に維持され、多くの目的のために高度に融通性があり有用で、さらに安定なトランスジェニック植物又は植物細胞での対象核酸及びタンパク質又はポリペプチドの発現又はそれらの一過性発現のために用いることができるので特に有益である。

【実施例】

【0066】

以下の実施例は例示として提供され、限定のためのものではない。特段の指示が無ければ、本発明は、分子生物学、細胞生物学、ゲノミクス、組換えDNA技術並びに植物生物学及び植物育種の通常技術及び方法を利用する。標準的な方法論は、特段の指示が無ければ例えば以下に記載されている (Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition; Sambrook and Russell, 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.; Ausubel et al. (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition. MacPherson et al. (1995) *PCR 2: a practical approach*. Oxford University Press)

【0067】

〔実施例1〕

pPMP1最小二元性ベクター及び最小植物選別性pC100二元性ベクターの開発

1.1 T-DNA領域及び骨格フラグメントの構築：

T-DNA領域及び本発明のベクターの骨格配列を含むポリヌクレオチドを化学的に合成した。第一のフラグメントは以下を含む：T-DNA右 (RB) 及びT-DNA左 (LB) 境界配列によって境界が形成されるT-DNA領域、pNOS (ノパリンシンターゼプロモーター) 及びtNOS (ノパリンシンターゼターミネーター) に作動できるように連結されたpBIN61 (約13,500塩基対のベクター：Bendahmane et al., 2000. *Plant Journal* 21: 73-81) の植物選別性カナマイシン耐性 (nptII) 遺伝子、及びPvuII制限部位とフランキングする固有のStuI、AscI及びEcoRI制限部位。この第一のフラグメントを、pUC誘導pMKベクター (Geneart, Regensburg, Germany) のPvuII部位でクローニングした。前記pMKは、ColE1複製起点 (ColE1ori) 及び細菌のカナマイシン耐性遺伝子 (KmR) を含んでいた。生成ベクターはpGA13と称した。

第二のフラグメントは、骨格配列 (ColE1複製起点及び最小RK2oriV複製起点を含む) 及びpBIN61のRK2由来TrfA複製開始タンパク質をコードする遺伝子を含む。この第二のフラグメントを固有のAscI、StuI及びPvuII制限部位を用いて化学的に合成し、pUC誘導pMAベクター (Geneart, Regensburg, Germany) でクローニングした (前記ベクターはまたアンピシリン耐性 (ApR) 遺伝子を含んでいた)。生成ベクターはpGA14と称した。

1.2 pC100最小植物選別性二元性ベクターの構築：

pC100 (図1A) は、pGA13のT-DNA領域をAscI-StuIフラグメントとしてpGA14ベクターの部分 (前記骨格配列を含みAscI及びStuIで消化されてある) でクローニングすることによって作製した。

1.3 pPMP1最小二元性ベクターの構築：

pPMP1 (5139bp; 配列番号：1; 図1B) は、pC100から植物選別性nptII遺伝子を欠失させることによって構築した。LBの上流の固有のEcoRI制限部位 (+1位) で始まる線形図を図1Cに示す。当該線形図の左から右にpPMP1は以下を含む：+1位の固有のEcoRI制限部位；+69から+94位のLB；250bpの第一のギャップ配列 (前記ギャップ配列はpPMP1の複製、細菌細胞での維持、又は植物細胞への当該T-DNA領域の移転において機能をもたない)；+653から+1454の配列をコードするKmR遺伝子並びに前記コード配列の上流及び下流の約300bpの調節性配列を含むおよそ1100bpの第一の配列；およそ150bpの第二のギャップ配列；+1602

10

20

30

40

50

から+2269位のColE1を含む第二の配列；およそ150bpの第三のギャップ配列；+3662から+2517位のTrfAのコード配列並びに前記コード配列の上流及び下流の約350bpの調節性配列を含むおよそ1500bpの第三の配列；およそ450bpの第四のギャップ配列；+4932から+4303位のRK2oriVを含む第四の配列；109bpの第五のギャップ配列；5041から5066位のRB及び+5139位の固有のEcoRI制限部位。

【0068】

〔実施例2〕

タバコの形質転換効率及びコピー数

2.1 タバコの形質転換：

pC100及び通常的に用いられるpBINPLUS二元性ベクター (Van Engelen et al., 1995. Transgenic Res. 4: 288-290) を、2つのアグロバクテリウム・ツメファシエンス株 (Ag11及びLBA4404) に導入した。pBINPLUS及びpC100は両方ともトランスジェニック植物細胞の選別のためにカナマイシン耐性遺伝子を含んでいた。細菌を適切な抗生物質を含む液体ブロスで一晩増殖させ、次の日に細菌細胞を遠心分離によって収集し、水に再懸濁した。水で希釈することによって、濃度を $OD_{600nm}=1$ に調整した。無菌的に成長させたニコチアナ・タバクム植物の葉の外植片を標準的な方法にしたがって形質転換し、20g/Lシュクロース及び8g/Lの精製寒天を補充したMurashige & Skoog (1962. Physiol. Plant 15: 473-497) の培地にてペトリ皿で2日間当業界で公知の適切な条件下で共培養した。2日間の共培養の後、形質転換体選別用カナマイシン、50mg/Lのバンコマイシン、250mg/Lのセフトキシム、トランスジェニックシュート再生用の0.1 mg/LのNAA及び1mg/LのBAPホルモンを含む選別培地に前記外植片を静置した。カナマイシン耐性タバコ植物を標準的なプロトコルにしたがって再生した。

2.2 形質転換効率：

pBINPLUS及びpC100によるアグロバクテリウム媒介形質転換後に100mg/Lのカナマイシン含有選別培地で発根したタバコのシュートの数を、これらのシュートから得られたトランスジェニックタバコ植物中のT-DNAコピー数とともに決定した。表1に要約した結果は、2つの独立した形質転換実験で、pC100の形質転換効率は、それぞれAg11について55%及び44%でLBA4404については47%及び24%であった (pBINPLUSについてはそれぞれ30%及び26%、52%及び18%であった)。

2.3 T-DNAコピー数：

(i) pC100を用いた形質転換の後に得られたそれぞれ独立した170のトランスジェニック植物及び (ii) pBINPLUSを用いた形質転換で得られたそれぞれ独立したトランスジェニック植物のコピー数を、両二元性ベクターのT-DNA上に存在するNPTIIカナマイシン耐性遺伝子のためのプライマーを用いて決定した (表2)。内部コントロールとしてさらに標準化のために、タバコのナイトレートレダクターゼ遺伝子 (NIA) を用いた。定量的リアルタイムQ-PCRを、Mx3005p (Stratagene) でABsolute™ QPCR Low ROXミックス (Axonlabs, AB-1319/A) 並びに光学用チューブストリップ及びキャップ (ABI (Applied Biosystems) パートn° 4316567及びn° 4323032) を用いて実施した。濃度及びPCR条件は以下のとおりであった：12 µLのABsolute™ QPCR Low ROXミックス、2 µLの各プライマー (5 µM) (詳細については表2を参照)、1 µLの各プローブ (5 µM) (表2参照) 及び2 µLのゲノムDNA (100ng)；95℃で15分、さらに95℃で30秒及び60℃で1分の50サイクル。NPTII及びNIAのアンプリコンを同じウェルで増幅させた。各サンプルをトリプリケートでアッセイし、MxPeoソフト (Ingham et al., 2001, Biotechniques 31: 132-140) 及びマイクロソフトExcelで分析した。pC100の植物の44% (170のうち74) が1コピーのT-DNA挿入 (pBINPLUSの植物では39% (121のうち47)) を有した (表3参照)。

【0069】

表1：2つの独立した形質転換実験で測定した、葉の外移植片のアグロバクテリウム・ツメファシエンスAg11及びLBA4404による形質転換を用いたpBINPLUS及びpC100の形質転換効率 (Exp. = 実験、外移植片 = 初めに用いられた外移植片の数、小植物 = 形質転換及び選別時に得られたカナマイシン耐性小植物の数)

株	構築物	Exp.	外移植片	小植物	効率%
Agl1	pBINPLUS	1	98	30	31
		2	100	26	26
	pC100	1	98	54	55
		2	100	44	44
LBA4401	pBINPLUS	1	91	47	52
		2	100	18	18
	pC100	1	90	47	52
		2	100	24	24

10

【0070】

表2：ナイトレイトレダクターゼ（NIA）及びネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（カナマイシン耐性）遺伝子のためのプライマーポリヌクレオチド配列

遺伝子	プライマー プローブ(配列番号)	配列 (5'-3')	色素	消光剤
NIA	PQ17F (配列番号：5)	GGAAAGAACAGAACATGGTTAA ACAA		
	PQ17R (配列番号：6)	ACACCGTACCGTTTAAACAAAG C		
	PQ17 (配列番号：7)	TGCCGCTGCCGTTTCAACAAC T	5'HEX	3'TAMRA
nptii	PQ24F (配列番号：2)	AGCTGTGCTCGACGTTGTCA		
	PQ24R (配列番号：3)	CCCCGGCACTTCGCCCAATA		
	PQ24 (配列番号：4)	TGAAGCGGGAAGGGACTGGC	5'FAM	3'TAMRA

20

【0071】

表3：カナマイシン耐性トランスジェニック植物のT-DNAコピー数

	T-DNAコピー		
構築物	1	2以上	植物
pBINPLUS	47	74	121
pC100	74	96	170

30

【0072】

〔実施例3〕

リツキシマブモノクローナル抗体の一過性発現

3.1 リツキシマブモノクローナル抗体を生成する発現ベクターの構築：

リツキシマブは、ネズミ/ヒトキメラモノクローナルIgG1抗体でありヒトCD20と結合する。リツキシマブは、多くのリンパ腫、白血病、移植片拒絶の治療に、さらにいくつかの自己免疫疾患の治療に用いられる。リツキシマブモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の完全長コード配列（CAS登録番号174722-31-7又はW002/060955）を含む発現カセットを作製した。コード配列のコドンの選択はタバコ植物での発現のために最適化された。

40

【0073】

C148で示されるリツキシマブ成熟重鎖配列（タバコに最適化されてある）

caagttcaacttcaacaaccagggtgctgaacttggttaagcctgggtgcttctgttaagatgtcttgcaaggcttctggata
cactttcacatcctacaacatgcatgggttaagcaaacccaggacgtggacttgaatggattggagctatctaccctg
gaaacggtgatacttctacaaccagaaggttcaagggaaaggctactcttactgctgataagtcctcttccactgcttac
atgcaactttcttcaactcacttccgaggattctgctgtttattactgcgctagggtccacttattatgggtggagattggta
cttcaatgtttggggagctggaactactgttactgtgtctgctgcttctactaagggaaccatctgttttccacttgctc
catcttctaagttacttccgggtggaactgctgctcttggtatgccttgtgaaggattatttccagagccagtgactgtt

50

tcttggaaactctgggtgctcttacttctgggtgttcacactttccagctgttcttccagtcactctggactttactccctttc
 ttctgttgttactgtgcatcttcttcaacttggaaactcagacttacatctgcaacgttaaccacaagccatctaacacaa
 aagtggataagaaggcagagccaaagtcttgtgataagactcatacttgtccaccatgtccagctccagaacttcttgg
 ggtccatctgttttcttgttcccacaaagccaaaggatactctcatgatctctaggactccagaagttacttgcgttgt
 tgtggatgttctcatgaggaccagaggttaagtccaactggtagctggatgggtgtgaagttcacaacgctaagacta
 agccaagataggaacagtacaactctacttaccgtgttgtgtctgtgcttactgttcttaccaggattggcttaacgga
 aaagagtacaaatgcaaggtttccaataaggctttgcccagctccaattgaaaagactatctccaaggcaaaaggacagcc
 tagagagccacaggtttacactcttccaccatctagagatgagcttactaagaaccaggtttcccttacttgtcttgtga
 agggattctacccatctgatattgctgtttagtgaggagtcacacggacagcctgagaacaactacaagactactccacca
 gtgcttgattctgatggttcccttcttcttactccaaactcactgtggataagtctagatggcagcagggaaatgtttt
 ctcttgcctcggtatgcatgaggctctccataatcactacactcagaagtcctttcttcttcttcttggaaagtga (

10

【0074】

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY
 MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR*EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK* (配列番号：32)

【0075】

20

成熟重鎖配列を合成した。前記は、HT-CPMVプロモーター並びにHT-CPMV非翻訳5'及び3'
 UTR配列（特許W009/087391に開示されている）、並びにカリフラワーモザイクウイルス3
 5Sターミネーター配列の制御下に配置されたパタチンシグナルペプチドを有する。

配列番号：34、atggccactactaaatcttttttaattttttatgtatattagcaactactagtccaacat
 gtgctは、パタチンシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列の例であり、前記はp
 C148で免疫グロブリン重鎖コード配列の5'末端に挿入される。

【0076】

パタチンシグナルペプチドを有する軽鎖は、特許W001/25455に記載されているようにプ
 ラストシアニンプロモーター及びターミネーター配列の制御下に配置された。

C148で示されるリツキシマブ成熟軽鎖配列（タバコに最適化されてある）

30

cagattgtgctttctcagctctccagctattctttctgcttccccaggtgaaaaggttacaatgacttgccgtgcttcttc
 ttctgtgtcctacattcattgggtccaacagaagccaggatcttctccaaagccatggatctacgtacttctaaccttg
 ctctgtgtgttccagttaggtttctggatctggatctggtacttcttactcccttactatttcttagagtggaggctgaa
 gatgtgctgctacttactactgccaacagtggacttctaattccaccaactttcggaggtggaactaagcttgagatcaagag
 gactgttgtgctccatctgtgttttttccaccatctgatgagcaacttaagtctggaactgcttctgttgtgtgcc
 ttctcaacaatttctaccaagggaaagctaaaggttcagtggaaagtggataatgctctccagctctggaaattctcaagag
 tctgtgactgagcaggattctaaggattccacttactcccttcttctactcttactcttccaaggctgattatgagaa
 gcacaaggtttacgcttgcaagttactcatcaggagcttcttccaccagtgacaaagtccttcaaccgtggagagtgtt
 ga (配列番号：35)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSPKPIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE
 DAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC* (配列番号：36)

40

pC148の免疫グロブリン軽鎖コード配列の5'末端は、パタチンシグナルペプチドをコー
 ドする配列番号：37のヌクレオチド配列と連結され、コドン使用頻度はタバコでの発現の
 ために最適化されてある。

atggccactactaagtccttcccttcttcttcatgatccttgcctactacttcttctacatgtgct (配列番号
 : 37)

【0077】

実施例1で述べたpC100のT-DNA部分で両発現カセットをクローニングし、pC148を作製し
 た。pCambia-2300 (GenBank: AF234315.1; Hajdukiewicz et al., 1994. Plant. Mol. Bi

50

ol. 25: 989-994) をプライマー、PC201F (5'-AGAAGGCCTTCCGGGACGGCGTCAG-3'; 配列番号: 8) 及びPC202R (5'-ATGGCGCGCCCCCTCGGGATCA-3'; 配列番号: 9) を用いPCRによって増幅して固有のStuI及びAscI制限エンドヌクレアーゼ切断部位を導入し、続いてリツキシマブ発現カセットを含むpC148のStuI/AscIフラグメントと連結して、pCambia-リツキシマブを作製した。

本発明は、先行する実施態様のいずれか1つに対応する上記に記載のベクターを意図し、前記ベクターは、T-DNA内に存在し、さらに植物の調節エレメントに作動できるように連結された、ヒトCD20と結合する免疫グロブリンの成熟重鎖をコードし、かつ配列番号: 32と少なくとも90%、92%、94%、96%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を示すヌクレオチド配列を含む。

10

本発明はまた、先行する実施態様のいずれか1つに対応する上記に記載のベクターを意図し、前記ベクターは、T-DNA内に存在し、植物の調節エレメントに作動できるように連結された、ヒトCD20と結合する免疫グロブリンの成熟軽鎖をコードし、かつ配列番号: 35と少なくとも90%、92%、94%、96%、98%、99%又は99.5%の配列同一性を示すヌクレオチド配列を含む。

3.2 ニコチアナ・ベンタミアナ植物の浸潤:

本実験で用いられる全てのベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンスAGL1に導入した。以下を含むYEB培地で細菌を28℃にてロータリーシェーカー (250rpm) でOD₆₀₀が1.6を超えるまでエーレンマイヤーで増殖させた: 2g/Lの牛肉抽出物、0.4g/Lの酵母抽出物、2g/LのBacto-ペプトン、2g/Lシュクロース、0.1g/L MgSO₄及び対応するアグロバクテリウム株の選別のために適切な抗生物質及び二元性ベクター。続いて、前記培養を新しいLBブロスミラー培地 (10mMの2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES) 及び適切な抗生物質含む) で1:100に希釈し、さらに28℃にてロータリーシェーカー (250rpm) でOD₆₀₀が2を超えるまで増殖させた。増殖後、4℃にて8000g、15分間遠心分離することによって細菌を収集した。ペレットになった細菌を浸潤溶液 (10mM MgCl₂及び5 mM MESを含み、最終pH 5.6) に再懸濁した (OD₆₀₀=2)。トマトブッシースタントウイルス (TBSV) p19遺伝子サイレンシングサプレッサー (Swiss-Prot P50625) を含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス株Agl1及びpC148又はpCambia-リツキシマブの1:1比 (最終OD_{600nm}=0.3) で4週齢のニコチアナ・ベンタミアナ植物を同時浸潤した。TBSV p19遺伝子サイレンシングサプレッサーのコード配列は、pBin19 (Bevan MW (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic Acids Res. 12: 8711-8721) 内でカリフラワーモザイクウイルス二35Sプロモーター及びターミネーター配列の制御下にあった。真空浸潤は、細菌接種物を満たした10Lビーカー中に大気中部分を浸漬することによって実施した。真空浸潤は、V-855レギュレーターに連結させたV-710ビュッヒ (Buchi) ポンプを用いてガラスのベルジャー (Schott-Duran Mobilex 300nm) 中で実施し、圧を3-4分で大気圧から50mbar絶対圧に低下させた。いったん真空に達したら、1分間真空を維持し、続いて約2秒で急速放出した。全浸潤プロセスを通じて人工照明 (80-100umol光子/cm²) を維持し、定常的照明条件を担保した。浸潤に続いて、採取まで植物を非浸潤コントロール植物と一緒に温室に置いた。生育条件 (例えば施肥、光周期及び温度) は、浸潤前に用いられたものと同じである。水及肥料はドリップ式灌漑系を用いて植物に与えた。

20

30

40

【0078】

3.3 採取、材料サンプリング及び発現の分析:

浸潤から6日後、葉の材料を断熱ポーチに収集し、密封してドライアイス層の間に10分間置いた。採取後、全ての葉のサンプルを更なる処理まで-80℃で貯蔵した。採取した葉をドライアイス上に置いたコーヒングラインダーを用いて微細粉末に均質化し、さらに3 vol/wtの抽出緩衝液中で抽出した。前記抽出緩衝液は、50mMトリス (pH 7.4)、150mM NaCl、0.1%トリトンX-100、4M尿素及び2mM DTTを含む。リツキシマブモノクローナル抗体の発現は前記可溶性抽出物でELISAによって定量した。捕捉抗体 (ヤギ抗マウスIgG1重鎖特異的抗体 (Sigma, #M8770)) の2.5 µg/mLでプレート (Immulon 2HB, Thermofisher) を一晩4℃で被覆した。偽似抽出物中のマウスIgG1コントロールタンパク質 (Bethyl, #MI

50

10-102)を用いて標準曲線(4-80 ng/mL)を作成した。偽似抽出物は、p19遺伝子サイレンシングサプレッサー細菌懸濁物だけで浸潤させた葉の材料から調製した。可溶性抽出物を稀釈緩衝液(50mMトリス(pH 7.4)、150mM NaCl、0.1%トリトンX-100)で1:1000に稀釈し、標準物及びサンプルをトリプリケートで添加し、37℃で1時間インキュベートした。検出用抗体は、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG Fc特異的抗体(Jackson ImmunoResearch: #115-035-205)で、1:40000の希釈で用い、37℃で1時間インキュベートした。抽出物中の全可溶性タンパク質は、クーマシープラスアッセイ(Coomassie-Plus Assay)試薬(Pierce: #24236)を用いて測定した。各組合せ(pC148とp19遺伝子サイレンシングサプレッサー及びpCambia-リツキシマブとp19遺伝子サイレンシングサプレッサー)のための6つの実験の結果は表4に提示される。ニコチアナ・ベンタミアナの葉でのリツキシマブの平均発現は、pCambia-リツキシマブについては葉の生重量(FW)1kgにつき122.60mgに対して、pC148については136.30mg/kgFWであった(表4参照)。

【0079】

表4: pCambiaから誘導した発現ベクターと比較した最小ベクターpC148によるN.ベンタミアナ植物におけるリツキシマブモノクローナル抗体の収量

構築物	実験	収量(mg/kgFW)	平均(mg/kgFW)	SEM
pC148	1	138.85	136.30	3.09
	2	140.66		
	3	142.68		
	4	140.58		
	5	122.61		
	6	132.42		
pCambia- リツキシマブ	7	105.59	122.60	5.46
	8	120.34		
	9	118.12		
	10	138.21		
	11	138.98		
	12	114.35		

【0080】

〔実施例4〕

インフルエンザH5ウイルス様粒子のタバコでの一過性発現

4.1 遺伝子構築物:

タバコエッチウイルス(TEV)のHcPro遺伝子サイレンシングサプレッサー単離体TEV7DA(GenBank: DQ986288.1)をpC100の固有EcoRI部位でクローニングしpC120を作製した。前記をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、TEV7DAの5'非翻訳領域及びノパリンシンターゼターミネーター配列の制御下に配置した。成熟ヘマグルチニンH5のコード配列を含む、H5N1ウイルスのヘマグルチニンのセグメント4(GenBank: EF541394.1)を、最小カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、HT-CMVの5'及び3'非翻訳領域並びにノパリンシンターゼターミネーター配列の制御下でpPMP1の固有EcoRI部位でクローニングして(実施例1参照)、pC229を得た。

4.2 ニコチアナ・タバクムの浸潤とサンプル調製:

全ての遺伝子構築物をアグロバクテリウム・ツメファシエンスAg11に導入した。ニコチアナ・タバクム植物を温室のロックウールブロックで、20時間照明、26℃/20℃の昼/夜温度、及び70%/50%の昼/夜相対湿度により成長させた。細菌は実施例3に記載したように最終OD₆₀₀が3.5まで増殖させた。pC229遺伝子構築物及びpC120遺伝子サイレンシングサプレッサー構築物を含むアグロバクテリウム培養を3:1の比率で混合し、さらに浸潤溶液(10 mM MgCl₂及び5mM MES(pH5.6)を含む)でOD₆₀₀=0.8に希釈した。細菌接種物を満たした10Lビーカー中に大気中部分を浸漬することによって、植物を浸潤させた。真空浸潤は

、15秒以内に大気圧から900mbarに圧を低下させ、60秒の保持時間に続いて約2秒で急速に放出することによって真空チャンバーで実施した。浸潤の後で、植物を温室に戻し、浸潤前と同じ環境条件下でインキュベートした。浸潤後5日で、浸潤植物の葉を10植物から収集し、スクリュプレス (Green Star Corrupad, GS 1000, Korea Co.) を用いて均質化した。メタ重亜硫酸ナトリウムを最終濃度10mMで添加してサンプルの酸化を防いだ。抽出物のpHを5.3に調整し、続いて攪拌しないで室温で20-30分インキュベートした。続いてセルピュア (Celpure) P300 (10%) を前記抽出物に添加し、1分間混合した。この溶液をセルピュアP300 (10mMのメタ重亜硫酸ナトリウム中の10%セルピュアスラリー) で前被覆したワットマンろ紙でろ過した。超遠心分離のために、3mLのシュクロースクッションを超遠心分離管に慎重に重層することによって調製した。異なる3つのクッションを以下のように調製した：(1) 3mLの80%シュクロース；(2) 各々1.5mLの60%及び45%シュクロース；及び(3) 各々1mLの60、45及び30%シュクロース。清澄化しろ過した抽出物サンプル (13mLまで) を前記シュクロースグラディエントの最上部に静かに置き超遠心分離に付した。遠心分離はスイングバケット型ローター (Sorvall Surespin 630; Kendro) で2400 0rpmにて1時間4℃で実施した (135,000 RCFmax)。シュクロース濃縮サンプルを0.45 µmのフィルターで前ろ過し、自動AKTAクロマトグラフィー系によりイソクラチック条件下でサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に付した。泳動緩衝液はTBS (pH7.5) で、サンプルサイズは、ハイロード (HiLoad) 16/60スーパーデックス200カラム ((GE Healthcare, 17-1069-01) にて流速1mL/分下で4mLであった。SDS-PAGE及びウェスタンブロットにより明示される精製H5 VLPを含む分画 (図3及び図4参照) をプールし、30kDaカットオフセントロリコン限外ろ過膜装置 (Millipore) を用いて約0.3mg/mLに濃縮し更なる分析を実施した。

【0081】

4.3 ゲル電気泳動及びウェスタンブロッティング：

標準的技術を用いて、プールした分画のサンプルをSDS-PAGE (図3A)、ウェスタンブロッティング (図3B及び4B) 及びブルーネイティブ-PAGE (図4A) に付した。SDS-PAGEは4-12%のSDS-PAGEゲルで実施した。コントロール (Ctrl+) として、市販の組換えH5 (Immun-e-tech, cat. #IT-003-0052p) を用いた。分離後、タンパク質をインペリアルMタンパク質染料 (Pierce #24615) で染色した。ウェスタンブロッティングについては、一次抗体はウサギ抗HA抗体 (H5N1 VN1203/04 # IT 003-005V) であった。検出にはHRP標識アフィニピュア (affiniPure) ヤギ抗ウサギIgG FC-フラグメント (Jackson #111-035-046) を用いた。検出は、イムノスター (Immuno-star) HRPケミルミネセントキット (BIO-RAD Laboratory, 170-5040) を用いてケミルミネセンスによって実施した。結果は、Chimio-Capt 3000を用いて捕捉し、図3Bに示す。図3A及びBは、pC229遺伝子構築物を浸潤させた植物抽出物で市販の組換えH5と同様なサイズのH5の存在を明瞭に示している。ネイティブPAGEは4-16%のBis-Tris PAGEゲル (Novex) で実施し、4℃で1時間インキュベートした。ネイティブPAGE G-250サンプル添加薬 (Novex) を最終濃度0.5%で添加し、サンプルをロードして4-16%のBis-Tris PAGEゲルで泳動した。ゲル泳動は、初めの60分は4℃にて150V定常で実施し、続いて電圧をさらに30分間250Vに上昇させた。ゲルはインペリアルMタンパク質染料で染色した。ネイティブPAGEの結果は図4Aに提示される。

ウェスタンブロッティングの結果は図4Bに提示され、タバコでの一過性発現に続いてH5の発現の成功が明瞭に示されている。

【0082】

4.4 血球凝集：

天然のトリマーH5タンパク質は、単糖類シアリン酸 (赤血球の表面に存在する) と結合する能力を有する。血球凝集と称されるこの特性は急速アッセイの基礎であり、本実施例では組換えタンパク質の生物学的活性の決定のために用いた。タバコによって生成されるH5の血球凝集活性を、植物抽出物及びサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 精製抽出物の1.5倍連続希釈を特定量の赤血球と96ウェルプレートでインキュベートすることによって測定した (図5)。HAと結合しない赤血球はウェルの底に沈み沈殿物を形成する。ホモ

トリマーとして正確に会合したHAのみが赤血球と結合できることに留意することが重要である。図5は、血球凝集活性はpC229遺伝子構築物を浸潤させたタバコ植物の抽出物及びpC229のサイズ排除クロマトグラフィー濃縮分画で観察されることを示している。

【0083】

〔実施例5〕

一コピートランスジェニック植物における骨格組み込みの決定

骨格フリー一コピートランスジェニック植物は規制に関する期待から大いに所望され、さらにトランスジーンサイレンシングのおそれが少ない。実施例2に記載したpC100によるタバコの形質転換に続いて得られた一コピーT-DNA組み込みをもつトランスジェニック植物で、pC100ベクターの骨格ヌクレオチド配列が存在するか否かを決定するために、pC100ベクターの一定のポリヌクレオチド配列を増幅する特定のプライマーを用いて一コピーpC100トランスジェニックタバコ植物の全てにおいてPCRを実施した。

【0084】

プライマー配列とPCR増幅：

pC100で形質転換した73の一コピートランスジェニックタバコ植物のゲノムDNAを標準的方法により単離した。配列番号：10ー配列番号：19から選択し表5に列挙した異なる10のプライマーを用いて、トランスジェニック植物の各々におけるpC100のベクター骨格又はT-DNA配列の存在を基準にして、7つのフラグメントを増幅することができた。pC100ベクター上のプライマー配列の位置は図6に模式的に表されている。

プライマー1（配列番号：10、5'-GAGCTGTTGGCTGGCTGG-3'）はベクター骨格配列の部分であり、T-DNA左境界ニック部位に対してpC100のT-DNA左境界の上流-18から-1に位置する。

プライマー2（配列番号：11、5'-GGCAGGATATATTGTGGTGTAAC-3'）はpC100のT-DNA左境界配列の部分であり、T-DNA左境界ニック部位に対して塩基対+2から+25に位置する。

プライマー3（配列番号：12、5'-GACCCCGCCGATGAC-3'）は、NPTII遺伝子の発現を制御するノパリンシンターゼプロモーターの部分であり、pC100のT-DNA左境界ニック部位に対してT-DNA左境界の上流の塩基対+122から+137に位置する。

プライマー4（配列番号：13、5'-CGCAATAATGGTTTCTGACGTA-3'）はノパリンシンターゼプロモーターの部分であり、pC100のT-DNA左境界ニック部位に対して下方鎖のT-DNA左境界の下流の塩基対+264から+232に位置する。

プライマー5（配列番号：14、5'-GTGATATTGCTGAAGAGCTTGG-3'）はNPTII遺伝子のカルボキシ末端の部分であり、pC100のT-DNA右境界ニック部位に対して上方鎖のT-DNA右境界の上流の塩基対-870から-848に位置する。

プライマー6（配列番号：15、5'-TTGCGCGCTATATTTGTTTTC-3'）はノパリンシンターゼターミネーター下方鎖の部分であり、pC100のT-DNA右境界ニック部位に対して塩基対-171から-151に位置する。

プライマー7（配列番号：16、5'-TAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTAC-3'）はpC100の下方鎖の-26から-1のT-DNA右境界配列をカバーし、pC100のT-DNA右境界ニック部位に対して前記位置にある。

プライマー8（配列番号：17、5'-AGGCGCTCGGTCTTGG-3'）は、T-DNA右境界下流の骨格ベクター下方鎖配列の部分であり、pC100のT-DNA右境界ニック部位に対して+87から+102塩基対に位置する。

プライマー9（配列番号：18、5'-GCGTTGGCTACCCGTGATAT-3'）及び10（配列番号：19、5'-ACATGCTTAACGTAATTCAACAG-3'）は、pC100のNPTII遺伝子内に位置するT-DNA内部プライマーである。

【0085】

プライマー対1及び4は左境界配列の上流からノパリンシンターゼプロモーターまでのpC100骨格配列の部分を含む272bpフラグメントを生成し、プライマー対2及び4は左境界配列からノパリンシンターゼプロモーターまでを含む253bpフラグメントを生成する。プライマー対3及び4は、ノパリンシンターゼプロモーター及びpC100のT-DNA上に位置するコード

配列を含む133bpフラグメントを生成する。プライマー対5及び6は、pC100のT-DNA上に位置するノパリンシンターゼコード配列及びターミネーター配列を含む720bpフラグメントを生成する。プライマー対5及び7は、pC100のノパリンシンターゼコード配列及びターミネーター配列並びにT-DNA右境界配列を含む870bpフラグメントを生成する。プライマー対5及び8は、ノパリンシンターゼコード配列及びターミネーター配列とともにT-DNA右境界配列及び右のT-DNA境界の下流のpC100ベクター骨格配列を含む972bpフラグメントを生成する。プライマー対9及び10は、内部NPTIIコード配列の626bpフラグメントを生成する。73の一コピー植物の全ての植物ゲノムDNAをマスターサイクルグラディエントマシーン（Eppendorf）を用いてPCRによって増幅させた。反応は、表5の記載にしたがって以下を含む20 μ L中で実施した：10 μ LのGoTaqグリーンマスターミックス（2X）（Promega）、7.5 μ Lの水、1 μ LのDNA、0.5 μ LのMgCl₂（25mM）及び表5に列挙したプライマー（10 μ M）の各々の0.5 μ L。サーモサイ클ラーの条件は、アニーリング温度として60℃を用い供給業者の指示にしたがって設定した。PCR生成物を1%アガロースゲルにロードし、80Vで1時間泳動した。PCR生成物のサイズはゲル分析系ケミスマート（ChemiSmart：Fisher Biotec）を用いて分析し、生成PCRフラグメントがあるプライマー対について指摘される予想フラグメントサイズにマッチした場合、サンプルはあるプライマーセットについて陽性と判定した。

5.2 結果：

結果は表5に要約されている。全ての一コピートランスジェニック植物（73/73）が、プライマー9及び10で増幅したとき内部フラグメントについて陽性であった。73の植物のうちいずれもT-DNA右境界ニック配列下流のpC100ベクター骨格配列を含まず、73植物のうち10（14%）でT-DNA右境界配列が組み込まれていた。73植物のうち3つのみが、T-DNA右境界配列と直にフランキングするノパリンシンターゼターミネーター配列のいくつかの部分の失い、残りの70（96%）はプライマー対5及び6について陽性であり、T-DNAの右側での正確な組み込みを示唆した。左側では、73植物の18（25%）がT-DNA左境界上流のベクター骨格pC100配列のいくつかを有していた。73植物の18（25%）ではまた左境界配列が組み込まれ、前記18植物は、当該実験の設計及びプライマーの位置を示す図6の模式図にしたがえば、ベクター骨格左境界配列を有する植物と同じ18植物であるはずである。73植物のうち63（86%）は、ノパリンシンターゼコード配列及びプロモーター配列について陽性で、T-DNAの左側での正確な組み込みを示唆している。

【0086】

表5：pC100で形質転換した73の一コピートランスジェニックタバコ植物の多様なプライマー対を用いたPCRの結果（前記プライマー対は下流の右境界及び上流の左境界ベクター骨格並びにT-DNA配列又はT-DNA内部配列のみを増幅する）

プライマー対	予想される アンプリコンサイズ	陽性植物 (%)
1及び4	272bp	18/73 (25%)
2及び4	253bp	18/73 (25%)
3及び4	133 bp	63/73 (86%)
5及び6	720 bp	70/73 (96%)
5及び7	870 bp	10/73 (14%)
5及び8	972 bp	0/73 (0%)
9及び10	626 bp	73/73 (100%)

【0087】

〔実施例6〕

ニコチアナ・タバクムでの一過性発現のための調節エレメントの比較

6.1 プロモーター及び調節領域：

転写又は翻訳レベルでの発現強化を可能にする多数のプロモーター領域及び調節配列を比較した。これらの発現カセットがT-DNA領域に挿入された最小ベクターpC100から誘導さ

れるベクターライブラリーを作成した。これらの“簡単クローニング対応 (ready to clone)”ベクターは対象タンパク質をコードする種々の遺伝子の容易な挿入を可能にする。下記に記載の実験は、2つの異なるタンパク質（インフルエンザのH5及び成熟ヒトグルコセレブロシダーゼ (GBA)）についての迅速評価を目的とした。

【0088】

表6：植物選別性マーカーを含む又は含まないpC100から作成したベクター

プロモーター	pC100誘導ベクター	pC100誘導ベクター：H5挿入あり	pC100誘導ベクター：nptII配列なし	pC100誘導ベクター：H5挿入あり、nptII配列なし
pMMV	pC193	pC264	pC277	pC275
pMMV 2x	pC243	pC259	pC278	pC270
pFMV	pC141	pC260	pC279	pC271
pFMV 2x	pC190	pC261	pC280	pC272
pPCISV	pC192	pC262	pC281	pC273
pPCISV 2x	pC265	pC263	pC282	pC274
CaMV35S 2x	pC265	pC266		pC276

10

【0089】

6.2 グルコセレブロシダーゼ (GBA)：

全てのGBAベクターで用いられた成熟ヒトグルコセレブロシダーゼ (GBA) はアクセッションNP_000148.2の配列と一致する。配列番号：38に示すDNA配列はタバコ用にコドンが最適化されており、化学的に合成された。したがって、本発明は、上記に記載の先行する実施態様のいずれか1つに対応するベクターを意図し、前記ベクターは、T-DNA領域中で植物調節性エレメントに作動出来るように連結された、成熟ヒトグルコセレブロシダーゼをコードし、さらに配列番号：38と少なくとも90%、92%、94%、96%、98%、99%又は99.5%配列同一性を示すヌクレオチド配列を含む。

20

当該タンパク質の以下の3形態をコードする3つのGBAを合成した：

－分泌GBA：分泌経路を通して当該タンパク質をアポプラストへ誘導するために、ソラナム・ツベロスム (*Solanum tuberosum*) パタチンAのN-末端の分泌シグナルペプチド (Gene Bankアクセッション番号CAA25592.1) を成熟GBA配列と融合した。得られた成熟生成物は、本来のタンパク質に匹敵するアミノ酸一次配列を示すと予想される。

30

－小胞体 (ER) 残留GBA：分泌経路を通して当該タンパク質を誘導するためにN-末端パタチンAペプチドを成熟GBA配列と融合し、さらに前記に加えてKDELペプチド (すなわち植物特異的ER残留シグナル) をC-末端に融合した。得られた成熟生成物は、C-末端に余分のアミノ酸としてKDELを保持すると予想される。

－空胞GBA：分泌経路を通して当該タンパク質を誘導するためにN-末端パタチンAペプチドを成熟GBA配列と融合し、さらに前記に加えてタバコキチナーゼA空胞ターゲティングシグナル (Shaaltiel Y. et al. 2007) をC-末端に融合した。得られた成熟生成物は、C-末端に空胞ターゲティングシグナルペプチドと一致する余分の7アミノ酸を保持すると予想される。

40

GBA配列を、プラストシアニンベクター、二MMVプロモーター (pMMV 2x) 及びHT-CPMV系を含む3つのpC100由来ベクターに導入した。

【0090】

合成によってデリバーされた成熟GBA配列 (タバコ用に最適化されてある)

gctagaccatgcattcctaagtctttcggttactcttctgttgtgtgcgtgtgcaatgctacttactgcgattctttcga
tctctctacttttctgtctcttgggtactttttctaggtacgagctaccaggtctggtagaagaatggaactttctatgg
gtcctatccaggctaatcatactgggtactgggtctgtcttcttactcttcaacctgagcagaagtccaaaagggttaagggt
tttgggtgtgtatgactgatgtctgtctcttaatatcttgggtctttctctctctgtctcaaaacttgcgtgtgaagtc
ttacttcagcgaagagggtatcggttacaacattattagggtgccaatggcttctctcgatttctctattaggacttata
cctacgtgtatccccctgatgatttccagcttcacaactttagcctgcctgaagaggataccaagctgaagattcctctt

50

attcatagggctctgcagcttgcctcaagacctgtttctcttttggcttctccttggacttctcctacttggcttaagac
 taatggctgtgtgaacggtaagggttctcttaagggtcaacctgggtgatatctaccatcaaacttgggctagatacttcg
 tgaagtctcttgatgcttacgctgagcataagttgcagtttgggctgttactgctgagaatgagccttctgctggctctt
 ttgtctgggtatccttttgcagtccttgggttctcctgaacatcagagggttctattgctagagatttgggtcctac
 ccttgctaattctactcatcataacgtgaggctgctgatgcttgatgatcagagacttcttttgcctcactgggctaagg
 ttgtgcttactgatcctgaagctgctaagtacgttcacgggtatgtgttctcactgggtacttggatttctgggtcctgct
 aaggctactcttgggtgaaactcataggcttttccctaacacccatgcttttgcctcagaggcttgcgttgggttctaagtt
 ttgggaacagctctgtgagacttggatcttgggatagagggtatgcagtacagccactctattattaccaacctgctgtacc
 atgtgggtgggttggactgattggaatcttgcctttaatcctgagggtgggtcctaattgggttaggaatttctggtgtagc
 cctatcatcgtggatattaccaaggataccttctacaagcagcctatgttctaccatcttggtcacttcagcaagttcat
 tccagaagggttctcagagggttggacttgttgccttctcaaaagaacgatcttgatgctgtggctcttatgcacctgatg
 gttctgctgttgttgttgccttaacaggcttagcaaggatgtgcctctgactatcaaagatcctgctgttgggttctta
 gagaccatttctcctgggttactctattcacacctacctttggcgctcgacaa (配列番号：38)

10

ARPCIPKSFYSSVVCNATYCDSDPPTFPALGTFSTRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKG
 FGGAMTDAAALNIALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPL
 IHRALQLAQRPVSLASPWTSPWLKTNGAVNGKGSLSKQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGL
 LSGYPFQCLGFTPEHQDFIARDLGPTLANSTHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLFLAPA
 KATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNALNPEGGPNWVRNFVDS
 PIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQVRGLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPVAGFL
 ETISPGYSIHTYLWRRQ (配列番号：39)

20

合成によってデリバーされるGBAの前のパタチンタバコ最適化配列 (クローニングのため
 にわずかに改変されてある)

Atggctactactaagtcttttctgatcctgttcttcatgattcttgcctactacctcgagcacgtgtgct (配列番号
 : 40)

【0091】

表7：GBAの一形態をコードする配列を含むベクター

C100誘導ベクター	発現カセット	生成物	ベクターコード
C241	プラスチアニン	分泌GBA	C248
		ER-残留GBA	C249
		空胞GBA	C251
C242	HT-CPMV	分泌GBA	C252
		ER-残留GBA	C253
		空胞GBA	C254
C243	pMMV 2x	分泌GBA	C255
		ER-残留GBA	C256
		空胞GBA	C257

30

【0092】

40

6.3 N.タバクムの成長及び浸潤：

N.タバクムの植物を発芽させ、20時間照明、26°C/20°Cの昼/夜温度、及び70%/50%の
 昼/夜相対湿度により温室で成長させた。人工照明は2時から22時の間で自動的に点灯し、
 この時、自然光は約100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ のPARを提供する15000又は20000Luxの照明系で200W/m²
 (20時間照明)である。植物は浮遊トレイ上で発芽させ、3週目の終わりには所望の発育
 段階に到達した。全ての構築物をアグロバクテリウム株AGL1株に浸潤によって導入した。
 浸潤に続いて、植物を温室で採取までインキュベートした。条件 (例えば施肥、光周期及
 び温度)は浸潤前に用いた条件と同じであった。葉の材料を浸潤後5日 (5dpi)で収集し
 た。植物の先端部の茎、葉柄及び非浸潤バイオマスは採取しなかった。続いて、前記の葉
 の材料をコーヒングラインダー及びドライアイスを用いて微細粉末に均質化した。

50

6.4 葉の抽出：

凍結させた葉の粉末のアリコットをH5抽出緩衝液（1x PBS、1% Tween-20（v/v）、4M 尿素）中にて1g凍結粉末：3mL緩衝液の比で2工程ボルテックス処理によって抽出し、続いて20000gで15分間遠心分離した。可溶性抽出物をNuPAGE LDS 4xサンプル緩衝液（50 mM DTTを含む）と3：1（v/v）の割合で混合し95℃で15分間加熱してから4－12%のBis-Tris NuPAGEゲルにロードした（各ウェルに10 μL）。ウェスタンブロッティングは標準的技術で実施した。一次抗体のウサギ抗HA（H5N1（VN1203/04））IgGは1：1000（v：v）に希釈した。二次抗体HRP-結合ヤギ抗ウサギ（Jackson；11-035-046）は1：10000に希釈した。アグロ浸潤タバコの粗抽出物の調製及びH5タンパク質の定量的ための酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）は標準的技術により実施した。

10

6.5 タンパク質発現の測定及び比較：

pMMV 2x（pC259）及びHT-CPMV（pC71）を用いて達成されたN.タバクムのH5発現の直接比較を実施した。0.55のOD₆₀₀のAg11接種物を用いた。別々の構築物中にサイレンシングサプレッサーとしてHc-Proを含む最小ベクターを、対象構築物（COI）：サイレンシングサプレッサー（SoS）比3：1で同時浸潤させた。各実験当たり12の植物からサンプリングしたところ、A259+A228（pMMV2x）からは凍結材料1kg当たり約65mgのH5が得られ、A71+A228からは凍結材料1kg当たり約55mgのH5が得られた。これらの結果から、pMMV2xは、N.タバクムでの組換えタンパク質の一過性発現のためにHT-CPMV発現カセットに対する良好な代替物であることが確認されよう。

6.6 H5をコードする構築物によるN.タバクムの浸潤：

20

種々の一強化及び／又は二強化の構成プロモーター（カウリモウイルスから単離）の制御下でH5をコードする構築物を、pC100から誘導したベクターを用いて作製し、A.ツメファシエンズ株AGL1に導入した。

N.タバクム植物をA228（最小ベクター中でHcPro SosをコードするC228構築物を保持するAGL1）及び以下の発現カセット下でH5をコードする構築物の1つを保持するAGL1で同時浸潤させた（OD₆₀₀=0.5及びCOI：SoS=1：1）：HT-CPMV（A71）、pMMV 2x（A259）、pFMV 1x（A260）、pFMV 2x（A261）、pPCISV 1x（A262）、pPCISV 2x（A263）、pMMV 1x（A264）又はpCaMV 35S 2x（A266）。全ての組合せを3回の浸潤実験について比較した。浸潤から5日後に、4つのアグロ浸潤植物をプールしたものをトリプリケートで採集し、各々のH5濃度をELISAで決定した。

30

【0 0 9 3】

6.7 H5発現の決定及び比較：

3回の浸潤についての比較を可能にするために、種々の発現カセットにより得られたバイオマス中のH5濃度を、pMMV2xで得られた濃度のパーセンテージとして表した（pMMV2xは全ての浸潤実験で最高レベルのタンパク質蓄積を示した（図8））。非常に低い発現レベルは、一強化FMV（A260）及びPCISV（A262）プロモーターを用いたとき得られた。前記PCISV及びFMVプロモーターにさらに追加のエンハンサーエレメントを挿入したときそれらの強度は数倍増加した。二強化PCISVプロモーター（A263）は、一強化MMVプロモーター（A264）で得られたH5蓄積（二強化MMVプロモーターで得られるH5濃度の迫る（70－90%））に匹敵し得る蓄積をもたらした。しかしながら、二強化FMVプロモーター（A261）によるH5発現は低く40－50%のままであった。CaMV 35S 2xプロモーターで得られたH5タンパク質蓄積は、二強化MMVプロモーターで得られたもののほんの40%であった。

40

6.7.1 GBAのウェスタンブロット分析：凍結した葉の粉末をGBA抽出緩衝液（PBS 1xTween-80 0.15%（v/v）、タウロコール酸ナトリウム0.15%（w/v）、5 mM DTT）にて1g凍結粉末：3mL緩衝液の比で2工程ボルテックス処理によって抽出し、続いて20000gで15分間遠心分離した。可溶性抽出物をNuPAGE LDS 4xサンプル緩衝液（50 mM DTTを含む）と3：1（v/v）の割合で混合し95℃で15分間加熱してから4－12%のBis-Tris NuPAGEゲルにロードした（10又は15ウェルの各ウェルにそれぞれ10 μL又は7 μL）。ウェスタンブロッティングは標準的技術にしたがって実施した。一次抗体：Sigma G4046（ウサギで作成された抗GBAペプチド）は1：2000に希釈、二次抗体：Jackson 11-035-046（抗ウサギHRP-結合）は1

50

：5000に希釈した。

6.7.2 酵素アッセイによるGBAの定量：浸潤N.タバクムの粗抽出物中の組換えGBAの定量は、参照タンパク質セレザイム（Cerezyme(商標)）で作成した標準曲線に対する酵素アッセイにより実施した。

6.8 結果：

種々のプロモーターによるGBAの相対的発現に関して、ウェスタンブロット分析は、二強化pMMV 2Xプロモーターはもっとも強いGBAタンパク質発現をもたらし、HT-CPMV翻訳因子エンハンサーカセットがこれに続き(連続希釈によれば概算で1/2-1/4)、もっとも弱い発現はプラストシアニンカセット（概算で1/8）で得られることを示した。

標準物質としてセレザイム(商標)（Genzyme Corp.）を用いたとき、ウェスタンブロット及びクーマシー染色SDS-PAGEゲルは、植物抽出物にスパイクした既知量のセレザイムのバンドの強度は浸潤葉の抽出物中のタバコ生成GBAタンパク質と一致するバンド強度を有することを示した。pMMV 2x発現カセット浸潤葉の材料から調製したA255、A256及びA257については、GBAに一致するバンドがクーマシー染色ゲルで視覚的に確認できた。3つの異なる発現カセットの制御下にある空胞GBAタンパク質の経過的蓄積のウェスタンブロット分析は、GBA濃度は浸潤後3日で低下し、続いて浸潤後4から7日には比較的安定らしいことを示した。

粗抽出物中のGBA濃度を定量する酵素アッセイを開発した（前記は合成基質4-MUGのGBAによる加水分解及び蛍光生成物4-MUの放出を基準にする）。GBAを含む植物抽出物を過剰な基質存在下でインキュベートし、酵素反応は定常状態（一定速度の生成物蓄積）であると見なす。標準曲線は、既知濃度の参照タンパク質セレザイムの連続希釈を用いてアッセイを実施した後で、蛍光（反応により生成される4-MUの量と直線的関係にある）を測定することによって決定される。この酵素アッセイを用いる粗抽出物中の組換えGBAタンパク質の定量は、セレザイムとタバコ生成hGBAが全植物素材と構築物について同様なKmを有するという実証済み想定を根拠にしていることを心に留めておくことは重要である。Kmの類似性は、二強化pMMVプロモーターの制御下で一過性に発現された3つのGBAタンパク質（空胞、分泌経路又はER残留に誘導されるタンパク質）について示された。以下のKm値が1回の単発実験で得られた：C255については1.4mM、C256については1.3mM、C257については1.2mM、セレザイムについては1.3mM（更なる詳細についてはProducts Candidates Development-GBA-PACKを参照されたい）。

酵素アッセイによって得られた結果はクーマシー/ウェスタンブロットで得られた結果と一致した。それらによって、用いた条件下では二強化pMMVプロモーターは最強のGBAタンパク質発現をもたらし、HT-CPMV翻訳因子エンハンサーカセットが前記に続き、もっとも弱い発現はプラストシアニンプロモーターにより得られることが確認される。さらにまた、空胞に誘導されるhGBAタンパク質は、ER-残留又は分泌型よりも高い濃度で蓄積されるようである。

【0094】

表8：多様な植物調節エレメントによってN.タバクムで生成されるGBA

GBA構築物 抽出	発現カセット	酵素アッセイによる定量 (mg GBA/kg凍結葉バイオマス)
A248	プラストシアニン-分泌GBA	5—10
A249	プラストシアニン-ER残留GBA	
A251	プラストシアニン-空胞GBA	
A252	35S HT-CPMV-分泌GBA	測定不能
A253	35S HT-CPMV-ER残留GBA	測定不能
A254	35S HT-CPMV-空胞GBA	20—35
A255	2x pMMV-分泌GBA	約20
A256	2x pMMV-ER残留GBA	20—35
A257	2x pMMV-空胞GBA	80—120

10

【0095】

試験した7つのカウリモウイルスプロモーターの中で、ミラビリスモザイクウイルス由来の二強化FLtプロモーター (pMMV 2x) はH5発現のために最強のプロモーターであった。このプロモーターは、N. タバクムにおける一過性H5発現用HT-CPMV系に対し、ベンチスケールにおいて匹敵し得るH5蓄積を生じる可能な代替物であり得る。比較に値するTurboGFP発現もまたpMMV 2x及びHT-CPMV発現カセットの両方を用いて得られた。

GBA発現のために、3つのプロモーター (pMMV 2x、HT-CPMV及び植物プロモータープラストシアニン) を比較した。この実験で用いた条件では、最高のタンパク質蓄積 (約100mg/kg葉バイオマス) は二強化pMMVプロモーターで得られ、HT-CPMV翻訳因子エンハンサーカセットが前記に続き (少なくとも1/2)、もっとも弱い発現はプラストシアニンプロモーターで得られた (少なくとも1/4)。

20

前記記述及び実施例では、配列表に提示されている以下の配列が参照される。

【0096】

配列番号：1 ベクターpPMP1のヌクレオチド配列

ctactagtcctccctagttacattaaaaacgtccgcaatgtgtatttaagttgtcttaagcgtcaattttgtttacaccacaata
tattctgtccaccagccagccaacagctccccgaccggcagctcggcacaataatcaccactcgatacaggcagcccatcag
gccttgacggccttcccttcaattcgccctatagtgagtcgtattacgtcgcgctcactggcgcgtcgttttacaacgtcgt
gactgggaaaaccctggcggttacccaacttaatcgcccttgagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaaga
ggcccgaccgaaacgccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaaatgggagcgccctgtagcggccactcaaccc
tatctcgggtctattcttttgatttataagggtatttgccgatttcggcctatttggttaaaaaatgagctgatttaacaaa
aatttaacgcgaatttttaacaaaatattaacgcttacaatttaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctta
tttggtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatatga
aaaaggaagagtattgattgaacaggatggcctgcatgcgggttagcccgccagcgtgggtggaacgtctgtttggctatga
ttgggcgcagcagaccattggctgctctgatgcggcggtgtttcgctctgagcgcgcagggtcgtccggtgctgttttgta
aaaccgatctgagcgggtgcgctgaacgagctgcaggatgaagcggcgctctgagctggctggccaccaccggtgttccg
tgtgcggcggtgctggatgtggtgaccgaagcgggcccgtgattggctgctgctgggcgaagtgcggggtcaggatctgct
gtctagccatctggcgccggcagaaaaagttagcatttatggcggatgccatgcgtcgtctgcataacctggaccggcgca
cctgtccgtttgatcatcaggcgaacatcgatttgaacgtgcgcgtaccgctatggaagcgggcttggtggatcaggat
gatctggatgaagaacatcaggcctggcaccggcagagctgtttgcgcgtctgaaagcgagcatgccggtggcgaaga
tctggtggtgacccatggtgatgcgtgcctgccgaacattatggtggaaaatggccgttttagcggctttattgattgcg
gccgtctggcggtggcggtatctatcaggatattgcgctggccaccgctgatatgagggaagaactgggcggcgaaatgg
gcggatcggtttctggtgctgtatggcattgcggcaccggatagccagcgtattgcgttttatcgctctgctggatgaatt
tttctaataactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatct
aggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgta
gaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctacc
agcgggtgggtttgtttgcccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaa
atactgttcttctagttgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacataacctcgctctgcta

30

40

50

atcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataa
 ggcgacgcggctcggtcgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacc
 tacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcgga
 acaggagagcgcacaggggagcttccagggggaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttctgccacctctgact
 tgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcc
 tggccttttctggccttttctcatttaggcacccccaggtttaccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcgagg
 aagcggagagcgcccaatacgaaggaaacagctatgacctgttaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaa
 gcgggcagtgaaaggaaggcccatgaggccagtttaattaacgatcgagtactaaatgccagtaaaagcgtggctgctgaa
 cccccagccggaactgaccccaacaggcccttagcgtttgcaatgcaccaggtcatcttgacccaggcgtgtccaccag
 gccgtgctctgcaactcttcgcaggttcgccgacctgctcgcgccacttcttcacgcgggtggaatccgatccgcaca
 tgaggcggaaaggtttccagcttgagcgggtacggctcccggtgcgagctgaaatagtcgaacatccgtcgggccgtcggc
 gacagcttcgggtacttctcccatatgaatttcgtgtagtggctgccagcaaacagcacgacgatttctcgtcgatcag
 gacctggcaacgggacgttttcttgccacgggtccaggacgcggaagcgggtgcagcagcgacaccgattccaggtgccaa
 cgcggctcgacgtgaagcccatcgccgtcgctttaggcgcgacagggcatttctcggccttcgtgtataaccggccattg
 atcgaccagcccaggtcctggcaaagctcgtagaacgtgaagtgatcggtcgcgcgatagggtgcgcttcgcgtactc
 caacacctgctgccacaccagttcgtcatcgtcggcccgacgtcgacgcgggtgtaggtgatcttcacgtccttgttga
 cgtggaaaatgaccttgttttcgagcgctcgcgcgggatttcttgttgcgctgggtgaacagggcagagcgggccgtg
 tcgtttggcatcgctcgcatcgttccggccacggcgcaatatcgaaacaggaaagctgcatttcttgcgtcgtgctt
 cgtgtgtttcagcaacgcggcctgcttggcctcgctgacctgttttgccaggtcctcgcggcggttttctgcttcttg
 tcgtcatagtctctcgcgtgctgatgggtcatcgacttcgcaaacctgcgcctcctgttcgagacgacgcaacgtcc
 acggcggccgatggcgcgggcagggcagggggagccagttgcacgctgtcgcgctcgatcttggccgtagcttgcgtggac
 catcgagccgacggactggaaggtttcgcggggcgcacgcatgacgggtgcggcttgcgatggtttcggcatctcggcgg
 aaaaccccgctcgatcagttcttgccctgtatgccttccgggtcaaacgtccgattcattcaccctccttgcgggattgcc
 ccgactcacgcggggcaatgtgcccttatctctgatttgaccgcctgggtgccttgggttcagataatccacctatc
 ggcaatgaagtcgggtcccgtagaccgtctggcgtccttctcgtacttgggtattccgaatcttgccctgcacgaatacca
 gcgaccccttgcccaataacttgccgtgggcttcggcctgagagccaaaacacttgatgcggaagaagtcgggtgcgtcc
 tgccttgcgcggcgcgttgcgcccacatatcgattatgatagaatttacaagctataaggttatgtccttgggtttcaa
 gcatttagtccatgcaagttttatgctttgcccattctatagatatattgataagcgcgtgcctatgccttgccccctg
 aaatccttacatacggcgatatctctatataaaaagatatattatcttcatcagttatgtcaatataatcaaggcaatctg
 cctcctcatcctcttcatcctcttctgcttggtagctttttaatatggcgcttcataagagtaattctgtaaaggtccaa
 ttctcgttttcatacctcggtataatcttacctatcacctcaaattgggttcgctgggtttatcgccccgggagggctcgaga
 agggggggcaccccccttcggcgtgcgcggtcacgcgcacagggcgagccctgggttaaaaacaaggtttataaatattg
 gtttaaaagcaggttaaaagacaggttagcgggtggccgaaaaacgggcggaaacccttgcaaatgctggattttctgcct
 gtggacagcccccaaatgtcaataggtgcgccccctcatctgtcagcactctgcccccaagtgtcaaggatcgcccc
 tcatctgtcagtagtcgcgccccctcaagtgtcaataccgcagggcacttatccccaggcttgtccacatcatctgtggga
 aactcgctgtaaaatcaggcgttttcgccgatttgcgaggttgccagctccacgtcgccggccgaaatcgagcctgcccc
 tcatctgtcaacgcgcgcgggtgagtcggccccctcaagtgtcaacgtcgccccctcatctgtcagtgagggccaaagt
 ttccgcgaggtatccacaacgcggcgccgcgggtgtctcgcacaggttcgacggcgtttctggcgcttgcagggc
 catagacggccgcagcccagcgcgagggaaccagcccgtgagcgtcgaaaggcgtcggtcttggcgcgccaacc
 ctgtggttggcatgcacatacaaatggacgaacggataaaccttttcacgccttttaaatatccgattattctaataaa
 cgctcttttctcttaggtttaccgcgaatatatcctgtcaaacactgatagtttaaacgaaggcgggaacgacaatc
 tgcctgcaggaattgaatt

【0097】

配列番号：2 nptiiのためのPQ24Fフォワードプロモーター

5'-AGCTGTGCTCGACGTTGTCA-3'

配列番号：3 nptiiのためのPQ24Rリバースプロモーター

5'-CCCCGGCACTTCGCCCAATA-3'

配列番号：4 nptiiのためのPQ24 Taqmanプローブ

5'-TGAAGCGGGAAGGGACTGGC-3'

配列番号：5 ナイトレートレダクターゼ遺伝子のためのPQ17Fフォワードプロモーター

50

5'-GGAAAGAACAGAACATGGTTAAACAA-3'

配列番号：6 ナイトレイトレダクターゼ遺伝子のためのPQ17Rリバースプロモーター

5'-ACACCGTACCGTTTTAACAAAGC-3'

配列番号：7 ナイトレイトレダクターゼ遺伝子のためのTaqmanプローブPQ17

5'-TGCCGCTGCCGTTTCAACAACTG-3'

配列番号：8 PC201Fフォワードプロモーター

5'-AGAAGGCCTTCCGGGACGGCGTCAG-3'

配列番号：9 PC202Rリバースプロモーター

5'-ATGGCGCGCCCCCTCGGGATCA-3'

配列番号：10 プライマー1のヌクレオチド配列

10

5'-GAGCTGTTGGCTGGCTGG-3'

配列番号：11 プライマー2のヌクレオチド配列

5'-GGCAGGATATATTGTGGTGTAAC-3'

配列番号：12 プライマー3のヌクレオチド配列

5'-GACCCCGCCGATGAC-3'

配列番号：13 プライマー4のヌクレオチド配列

5'-CGCAATAATGGTTTCTGACGTA-3'

配列番号：14 プライマー5のヌクレオチド配列

5'-GTGATATTGCTGAAGAGCTTGG-3'

配列番号：15 プライマー6のヌクレオチド配列

20

5'-TTGCGCGCTATATTTTGTTC-3'

配列番号：16 プライマー7のヌクレオチド配列

5'-TAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTAC-3'

配列番号：17 プライマー8のヌクレオチド配列

5'-AGGCGCTCGGTCTTGG-3'

配列番号：18 プライマー9のヌクレオチド配列

5'-GCGTTGGCTACCGTGATAT-3'

配列番号：19 プライマー10のヌクレオチド配列

5'-ACATGCTTAACGTAATTCAACAG-3'

配列番号：20 最小35S-CaMVプロモーター

30

gaaacctcctcgattccattgcccagctatctgtcactttattgagaagatagtggaagggaaggtggctcctacaaa
tgccatcatgtcgataaaggaaaggccatcggtgaagatgcctctgccgacagtgggtcccaaagatggacccccccac
gaggagcatcggtgaaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggttgatgtgatatctccactgacgtaa
gggatgacgcacaatccactatccttcgaagacccttctctatataaggaagttcatcttcatcttgagagg

配列番号：21 5'UTR HT-CPMV

Tattaaaatcttaataggttttgataaaagcgaacgtggggaaacccgaaccaaaccttcttctaaactctctctcatct
ctcttaaagcaaacttctctcttcttcttgcgtgagcgatcttcaacgttgctcagatcggtcttcggcaccagtaca
acgttttcttctactgaagcgaatcaaagatctcttcttggtgacagtagtgcgcgccattaaataacgtgtacttgct
ctattcttctcggtgtggtcttgggaaaagaaagcttgctggaggtgctgttcagccccatacattactgttacgatt
ctgctgactttcggcgggtgcaatatctctacttctgcttgacgaggtattgttgctgtacttcttcttcttcttctt
gctgattggttctataagaaatctagtatttcttggaaacagagtttcccggtggttttcgaacttgagaaagattgt
taagcttctgtatattctgcccatttctcgggccc

配列番号：22 3'UTR HT-CPMV

Attttcttttagtttgaatttactgttattcggtgtgcatttctatgtttggtgagcggttttctgtgtcagagtgtgtt
tattttatgtaatttaatttcttcttgtagctcctgttttagcaggctcgctcccttcagcaaggacacaaaaagattttaatt
ttattaaaaaaaaaaaaaaaaagaccggg

配列番号：23 P1-HcPro-P3

atggcactcatctttggcacagtcaacgctaacatcctgaaggaagtgttcggtggagctcgatatggcttgcgttaccag
cgcacatatggctggagcgaatggaagcattttgaagaaggcagaagagacctctcggtgcaatcatgcacaaaccagtga
tcttcggagaagactacattaccgaggcagacttgcccttacacaccactccatttagaggctgatgctgaaatggagcgg

50

atgtattatcttggctgctcgcgctcaccatggcaagagacgcaaagtttctgtgaataacaagaggaacaggagaag
gaaagtggccaaaacgtacgtggggcgtgattccattgttgagaagattgtagtccccacaccgagagaaaggttgata
ccacagcagcagtggaagacatttgcaatgaagctaccactcaacttgtgcataatagtatgccaaagcgtagaagcag
aaaaacttcttggccgccacttactaagtaacgtgtatgccaaaacttggagcatagtgcgcaaacgccatatgcagggt
ggagatcatttagcaagaagagcgtccgagcggaggtcaagagatttgagggctcggtgcaattgttcgcaagtgtgcgtc
acatgtatggcgagagggaaaaggggtggacttacgtattgacaactggcagcaagagacacttctagacctgtctaaaaga
tttaagaatgagagagtggatcaatcgaagctcacttttgggtcaagtggcctagttttgaggcaaggctcgtacggacc
tgcgcattgggtatcgacatgggtatgttcatgttacgcggtcggtcggtatgggatgttgggtggatgctcgtgcgaaggtaa
cgttcgctgtttgtcactcaatgacacattatagcgaccatcaccatcaccatcacgcgtccgacaaatcaatctctgag
gcattcttcataccatactcctaagaaattcttggagttgagaccagatggaatctcccatgagtgtagaagaggagtatc
agttgagcgggtgcggtgaggtggctgcaatctgacacaagcactttcacctgttggttaagatcacatgcaaactgtgca
tggttgaaacacctgacattgttgagggtagtcgggaggaagtgtcaccaaccaaggttaagctccctagcaatgttgaaa
gaacagtatccagatttcccaatggccgagaaactactcacaaggtttttgcaacagaaatcactagtaaatacaaat
gacagcctgcgtgagcgtcaaaacactcattgggtgacgcgaacaaagctccattcacacacgtactggctgtcagcgaaa
ttctgttttaaaggcaataaactaacaggggcccgtctcgaagggaagcagacacatatgcttgaaatagcaaggttcttg
aacaatcgcactgaaaatatgcgcattggccaccttgggtcttccagaaataaaatctcatcgaaggcccatgtgaataa
cgcactcatgtgtgataatcaacttgatcagaatgggaattttatttggggactaaggggtgcacacgcaaagaggttct
ttaaaggatttttactgagattgacccaaatgaaggatacagataagtatgttatcaggaaacatatcaggggtagcaga
aagctagcaattggcaatttgataatgtcaactgacttccagacgctcaggcaacaaatcaaggcgaaactattgagcg
taaagaaattgggaatcactgcatttcaatgcggaatggtaattacgtgtacccatgttgttgtgttactctgaagatg
gtaaggctcaatatcggatctaaagcatccaacgaagagacatctgggtcattggcaactctggcgattcaaagtaccta
gacctccagttctcaatgaagagaaaatgtatatagctaatgaaggttatgtctacatgaacatttctttgctctact
agtgaatgtcaaggaagaggatgcaaaggacttcaccaagtttataagggaacacaattgttccaaagcttggagcgtggc
caacaatgcaagatgttgcaactgcatgctacttactttccattctttaccagatgtcctgagtgctgaattaccaga
attttgggttgatcatgacaacaaacaatgcatgttttggattcgatgggtctagaacgacaggataccacatgttgaa
aatgaacacaacatcccagctaattgaattcgttcatcaggtttggaatccgaaatgaaaacttacaatgttgaggga
tgaaccgagatatggtcacacaaggtgcaattgagatgttgatcaagtccatatacaaccacatctcatgaagcagttat
cttgaggaggagccatacataattgtcctggcaatagctctcccttcaatttttaattgcatgtacaactctggaacttt
tgagcaggcgttacaaatgtgggttgccaaatacaatgaggttagctaacctcgctgccatctgtcagccttggcgcaa
agtttaactttggcagacttgttcgtccagcagcgttaatttgattaatgagtatgcgaggttaattttggacaatctgatt
gacggtgtcagggttaaccattcgctatccctagcaatggaattgttactattaagctggccaccaagagatggacat
ggcgttgagggaaggtggctatgctgtgacctctgcagatcgttcaaacatttggaataa

配列番号：24 インフルエンザヘマグルチニン5 (H5)

atggagaaaatagtgcttcttcttgcaatagtcagcttgtttaaagtgtatcagatttgcatgggttaccatgcaaaca
ttcaacagagcagggtgacacaatcatggaaaagaacgttactgttacacatgccaagacatactggaaaagacacaca
acgggaagctctgcgacttagatggagtgaagcctctaattttaagagattgtagttagctggatggctcctcgggaa
ccaatgtgtgacgaattcatcaatgtaccggaatggcttcatatagttggagaaggccaatccaaccaatgacctctgtta
cccaggaggtttcaacgactatgaagaactgaaacacctattgagcagaataaaccattttgagaaaattcaaatcatcc
ccaaaagtcttgggtcgatcatgaagcctcatcaggagttagctcagcatgtccataacctgggaagtcctctcttttt
agaaatgtggtatggcttatcaaaaagaacagtacataaccaacaataaagaaaagctacaataataccaaccaagagga
tcttttgggtactgtggggaattcaccatcctaatgatgcggcagagcagacaaggctatatcaaaaccaaccacctata
tttccattgggacatcaacactaaaccagagattggtacaaaaaatagctactagatccaaagtaaacgggcaaagtgg
aggatggagtcttcttggaacaattttaaacctaatgatgcaatcaacttcgagagtaattggaaatttcatgtgtccaga
atatgcatacaaaaattgtcaagaaaggggactcagcaattatgaaaagtgaattggaatatggtaactgcaacaccaagt
gtcaaacccaatgggggcgataaactctagtatgccattccacaacatacaccctctcaccatcggggaatgccccaaa
tatgtgaaatcaaacagatttagtcttgcaacagggtcagaaaatagccctcaaagagagagcagaagaaaaagagagg
actattttggagctatagcaggttttatagaggggaggatggcagggaattggttagatgggttggtatgggtaccacatagca
atgagcaggggagttgggtacgtgcagacaaagaatccactcaaaaggcaatagatggagtaccaataaggtcaactca
atcattgacaaaaatgaacactcagtttgaggccgttggaaagggaatttaataacttagaaaggagaatagagaatttaaa
caagaagatggaagacgggtttctagatgtctggacttataatgccgaacttctgggtctcatggaaaatgagagaactc

10

20

30

40

50

tagactttcatgactcaaatgttaagaacctctacgacaaggtccgactacagcttagggataatgcaaaggagctgggt
aacggttggttcgagttctatcacaatgtgataatgaatgtatggaaagtataagaaacggaacgtacaactatccgca
gtattcagaagaagcaagattaaaaagagaggaaataagtggggtaaaattggaatcaataggaacttacaaatactgt
caatttattcaacagtggcgagttccctagcactggcaatcatgatggctgggtctatctttatggatgtgctccaatgga
tcggttacaatgcagaatttgcatttaa

配列番号：25 EcoR1とHind3部位との間の一強化pMMV

gaattcgtaacttcgtccacagacatcaacatcttatcgctctttgaagataagataataatgttgaagataagagtgg
gagccaccactaaaacattgctttgtcaaaagctaaaaaagatgatgcccagacagccacttgtgtgaagcatgagaagcc
ggtccctccactaagaaaatttagtgaagcatcttccagtgggtccctccactcacagctcaatcagtgagcaacaggacga
aggaaatgacgtaagccatgacgtctaatcccacaagaatttccttatataaggaacacaaaatcagaaggaagagatcaa
tcgaaatcaaaatcggaatcgaaatcaaaatcggaatcgaaatctctcatctaagctt

10

配列番号：26 EcoR1とHind3部位との間の二強化pMMV

gaattcgtaacttcgtccacagacatcaacatcttatcgctctttgaagataagataataatgttgaagataagagtgg
gagcccccactaaaacattgctttgtcaaaagctaaaaaagatgatgcccagacagccacttgtgtgaagcatgagaagcc
ggtccctccactaagaaaatttagtgaagcatcttccagtgggtccctccactcacagctcaatcagtgagcaacaggacga
aggaaatgacgtaagccatgacgtctaatcccacttcgtccacagacatcaacatcttatcgctctttgaagataagat
aataatgttgaagataagagtgggagccaccactaaaacattgctttgtcaaaagctaaaaaagatgatgcccagacagcc
acttgtgtgaagcatgagaagccggtccctccactaagaaaatttagtgaagcatcttccagtgggtccctccactcacagc
tcaatcagtgagcaacaggacgaaggaaatgacgtaagccatgacgtctaatcccacaagaatttccttatataaggaac
acaaatcagaaggaagagatcaatcgaaatcaaaatcggaatcgaaatcaaaatcggaatcgaaatctctcatcttaagct
t

20

配列番号：27 EcoR1及びHind3部位との間の一強化pFMV

gaattcgtaacatcgagcagctggcttgtggggaccagacaaaaaaggaatgggtgcagaattgttaggcgcacctacca
aaagcatctttgcctttattgcaaagataaagcagattcctctagtacaagtggggaacaaaataacgtggaaaagagct
gtcctgacagcccactcactaatgcgtatgacgaacgcagtgcgaccacaaaagattgcccgggtaatccctctatata
agaaggcattcattcccatttgaaggatcatcagatactcaaccaatatttctcactctaagaaattaagagctttgtat
tcttcaatgaggggctaagacccaagctt

配列番号：28 EcoR1及びHind3部位との間の二強化pFMV

gaattcgtaacatcgagcagctggcttgtggggaccagacaaaaaaggaatgggtgcagaattgttaggcgcacctacca
aaagcatctttgcctttattgcaaagataaagcagattcctctagtacaagtggggaacaaaataacgtggaaaagagct
gtcctgacagcccactcactaatgcgtatgacgaacgcagtgcgaccacaaaagattgcccacatcgagcagctggct
tgtggggaccagacaaaaaaggaatgggtgcagaattgttaggcgcacctacaaaagcatctttgcctttattgcaaaga
taaagcagattcctctagtacaagtggggaacaaaataacgtggaaaagagctgtcctgacagcccactcactaatgcgt
atgacgaacgcagtgcgaccacaaaagattgcccgggtaatccctctatataagaaggcattcattcccatttgaagga
tcatcagatactcaaccaatatttctcactctaagaaattaagagctttgtattcttcaatgagaggctaagacccaagc
tt

30

配列番号：29 EcoR1及びHind3部位との間の一強化pPCISV

gaattcaattcgtcaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgatgtgacctaaagcaataatggagccatgacgta
agggcttacgccatacgaataattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacctttactttttatatttggcg
tgtatttttaaatttccacggcaatgacgatgtgacctgtgcatccgctttgcctataaataagtttttagtttgtattga
tcgacacgatcgagaagacacggccataaagctt

40

配列番号：30 EcoR1及びHind3部位との間の二強化pPCISV

gaattcgtaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgatgtgacctaaagcaataatggagccatgacgtaagggc
ttacgccatacgaataattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacctttactttttatgtttggcgtgtat
ttttaaatttccacggcaatgacgatgtgacccaacgagatcttgagccaatcaaagaggagtgatgtgacctaaagca
ataatggagccatgacgtaagggttacgccatacgaataattaaaggctgatgtgacctgtcggtctctcagaacct
ttactttttatatttggcgtgtatttttaatttccacggcaatgacgatgtgacctgtgcatccgctttgcctataaat
aagtttttagtttgtattgatcgacacggtcgagaagacacggccataaagctt

配列番号：31 パタチンシグナルペプチド

MATTKSFLILFFMILATTSSTCA

50

配列番号：32 リツキシマブ成熟重鎖配列（タバコ用に最適化されてある）

caagttcaacttcaacaaccaggtgctgaacttgtaagcctgggtgcttctgttaagatgtcttgaaggcttctggata
cactttcacatcctacaacatgcattgggttaagcaaactccaggagctggacttgaatggattggagctatctaccctg
gaaacggtgatacttcttacaaccagaagtccaagggaaggctactcttactgctgataagtcctcttccactgcttac
atgcaactttcttcaactcacttccgaggattctgctgtttattactgcgctaggctccacttattatggtggagattggt
cttcaatgtttggggagctggaactactgttactgtgtctgctgcttctactaagggaccatctgttttccacttgctc
catcttctaagtcctacttccgggtggaactgctgctcttggatgccttgtgaaggattatttcccagagccagtgactgtt
tcttggaaactctgggtgctcttacttctgggtgttcacactttcccagctgttcttcaagtcacttggactttactcccttc
ttctgttgttactgtgccatcttcttcaacttggaaactcagacttacatctgcaacgttaaccacaagccatctaacaca
aagtggataagaaggcagagccaaagtcttgtgataagactcatacttgtccaccatgtccagctccagaacttcttgggt
ggccatctgttttcttgttcccaccaaagccaaaggatactctcatgatctctaggactccagaagttacttgcgttgt
tgtggatgtttctcatgaggaccagaggttaagttcaactggtagctggatgggtgtgaagttcacaacgctaagacta
agccaagataggaacagtacaactctacttaccgtgttgtgtctgtgcttactgttcttaccaggattggcttaacgga
aaagagtacaaatgcaaggtttccaataaggctttgccagctccaattgaaaagactatctccaaggcaaaaggacagcc
tagagagccacaggtttacactcttccaccatctagagatgagcttactaagaaccaggtttcccttacttgtcttgtga
agggattctaccatctgatattgtctgttgagtgggagtcacacggacagcctgagaacaactacaagactactccacca
gtgcttgattctgatggttcccttcttcccttactccaaactcactgtggataagcttagatggcagcagggaaatgtttt
ctcttgctccgttatgcatgaggctctccataatcactacactcagaagtcctttcttcttcttcttggaaagtga

10

配列番号：33 リツキシマブ成熟重鎖アミノ酸配列

QVQLQQPAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR*EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

20

配列番号：34 C148に示される、タバコ用に最適化されていない（わずかに改変された）
）パタチン配列（重鎖の前に存在する）

atggccactactaaatcttttttaattttattttttatgatattagcaactactagttcaacatgtgct

配列番号：35 リツキシマブ成熟軽鎖配列（タバコ用に最適化されてある）

cagattgtgctttctcagctctccagctattctttctgcttccccagggtgaaaagggttacaatgacttgccgtgcttcttc
ttctgtgtcctacattcattgggtccaacagaagccaggatcttctccaaagccatggatctacgctacttctaaccttg
cttctgggtgttccagttaggttttctggatctggatctgggtacttcttactcccttactatttcttagagtggaggctgaa
gatgtgctgctacttactactgccaacagtggacttctaatccaccaactttcggagggtggaactaagcttgagatcaagag
gactgttgtgtgctccatctgtgtttattttcccaccatctgatgagcaacttaagcttggaaactgcttctgttgtgtgcc
ttctcaacaatttctaccaagggagctaaggttcagtggaaagtggataatgctctccagctctggaaattctcaagag
tctgtgactgagcaggattctaaaggattccacttactcccttcttctactcttactcttccaaggctgattatgagaa
gcacaaggtttacgcttgcaagttactcatcaggagctttcttaccagtgacaaagtccttcaaccgtggagagtgtt
ga

30

配列番号：36 リツキシマブ成熟軽鎖アミノ酸配列

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE
DAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

40

配列番号：37 C148に示される、タバコ用に最適化されたパタチン配列（軽鎖の前に存在する）

atggccactactaagtccttcccttatacctcttcttcatgatccttgcctactacttcttctacatgtgct

配列番号：38 成熟GBA配列（タバコ用に最適化されてある）

gctagaccatgcattcctaagtccttctcggttactcttctgttgtgtgcgtgtgcaatgctacttactgcgattctttcga
tcctcctacttttctgctcttgggtacttttcttaggtacgagctaccaggctctggtagaagaatggaactttctatgg
gtcctatccaggctaatactactggtactgggtctgcttcttactcttcaacctgagcagaagttccaaaagggttaagggt
tttgggtggtgctatgactgatgctgctgctcttaatatcttggctctttctcctcctgctcaaaacttgctgctgaagtc

50

ttacttcagcgaagagggtatcggttacaacattattaggggtccaatggcttcttgcgattttctctattaggacttata
cctacgctgataccccctgatgatttccagcttcacaactttagcctgcctgaagaggataccaagctgaagattcctctt
attcatagggctctgcagcttgcctcaaagacctgtttctcttttggcttctccttggacttctcctacttggcttaagac
taatggctgctgtgaacggtaagggttctcttaagggtcaacctgggtgatatctaccatcaaacttgggctagatacttcg
tgaagttccttgatgcttacgctgagcataagttgcagtttgggctgttactgctgagaatgagccttctgctggctctt
ttgtctgggttatecttttcagtccttgggttctactcctgaacatcagagggtttcattgctagagatttgggtcctac
ccttgctaattctactcatcataacgtgaggctgctgatgcttgatgatcagagacttcttttgcctcactgggctaagg
ttgtgcttactgatcctgaagctgctaagtaacgttccaggtattgctgttctactgggtacttggattttctggctcctgct
aaggctactccttgggtgaaactcataggttttccctaacaccatgcttttgcctcagaggcttgcgttgggttctaagtt
ttgggaacagctctgtgagacttggatcctgggatagagggtatgcagtacagccactctattattaccaacctgctgtacc
atgtgggtgggttggactgattggaatccttgctcttaactcctgagggtgggtcctaattgggttaggaatttctggtgtagc
cctatcatcgtggatattaccaaggataccttctacaagcagcctatgttctaccatcttggctacttcagcaagttcat
tccagaagggttctcagagggttggacttgttgcttctcaaaagaacgatcttgatgctgtggctcttatgcacctgatg
gttctgctgttgttgttgtgcttaacaggctctagcaaggatgtgcctctgactatcaaagatcctgctgttgggttctta
gagaccatttctcctgggttactctattcacacctacctttggcgctgacaaa

配列番号：39 成熟GBAアミノ酸配列

ARPCIPKSFYSSVVCNATYCDSPPTFPALGTFSTRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKG
FGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPL
IHRALQLAQRVPVLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGS�KGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGL
LSGYPFQCLGFTPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGI AVHWYLDLFLAPA
KATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDS
PIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQVRGLVASQKNDLDAVALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDPVAGFL
ETISPGYSIHTYLWRRQ

配列番号：40 GBAの前に存在するタバコ用に最適化されたパタチン配列

atggctactactaagttcttctgatcctgttcttcatgattcttctgctactacctcgagcacgtgtgct

【0098】

〔参考文献〕

- Alberts et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York. ISBN: 0-8153-3218-1
- Bevan (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids. Res.* 12: 8711-8721.
- De Buck et al. (2000) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* 6: 459-468. 10
- Fraley et al. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4807.
- Hajdukiewicz et al. (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant. Mol. Biol.* 25: 989-994.
- Ingham et al. (2001) Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques* 31: 132-140.
- Kosonov et al. (1997) Integration of T-DNA binary vector "backbone" sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 11: 945-957. 20
- Lee and Gelvin (2008) T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology* 146: 325-332.
- Liu et al. (1999) Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6535-6540.
- Ramanathan and Veluthambi, 1995. *Plant Mol. Biol.* 28: 1149-1154) 30
- Schmidhauser and Helinski (1985) Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164: 446-455.
- Wenck et al. (1997) Frequent colinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 34: 913-922.
- Zambryski et al. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2: 2143-2150. 40

【図 1 B】

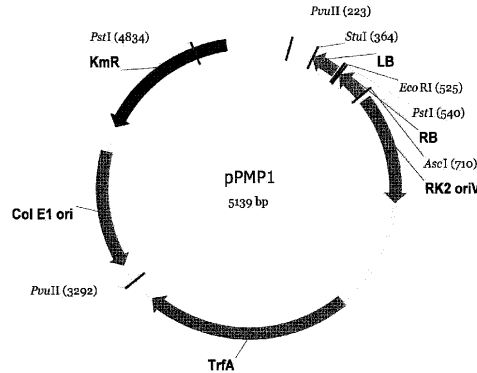


FIGURE 1B

【图 2-2】

FIGURE 2 (CONT.)

[illegible]

【図 6】

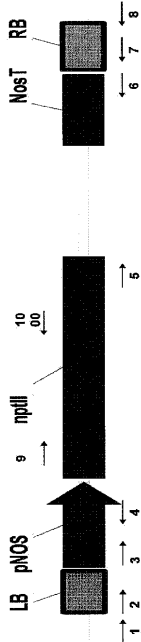


FIGURE 6

【図 1 C】

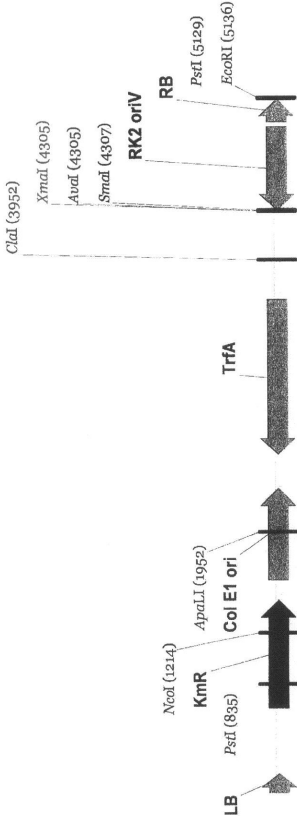


FIGURE 1C

【図 3】

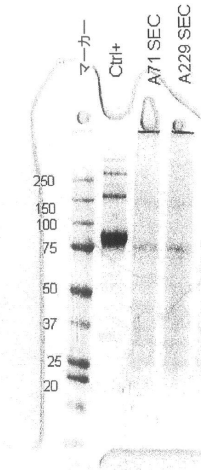


FIGURE 3

【図 4】

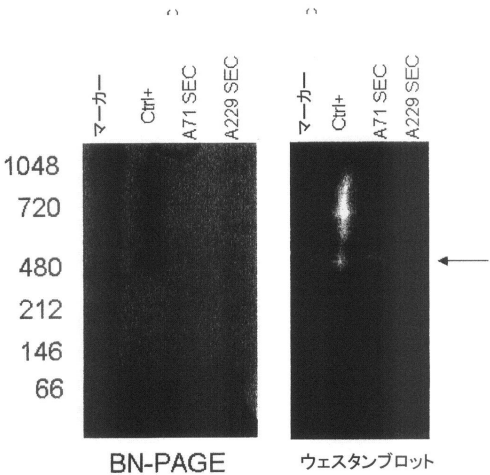


FIGURE 4

【図 5】

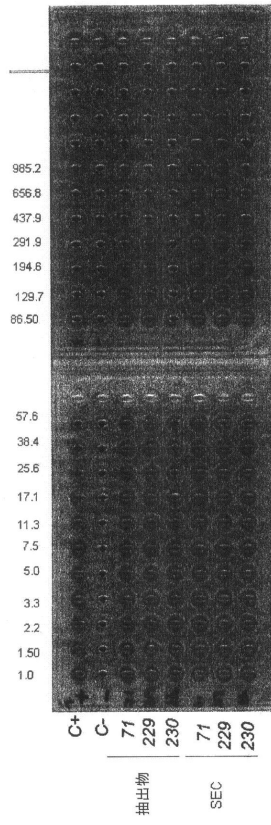


FIGURE 5

【図 8】

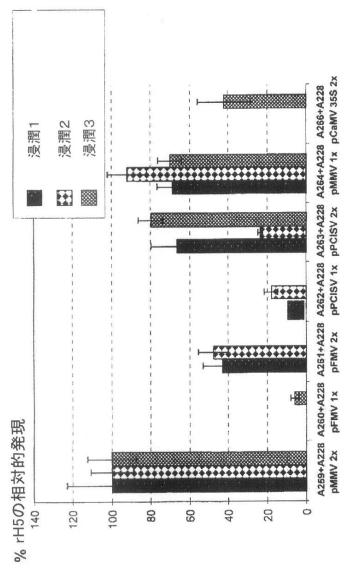


FIGURE 8

【図 7】

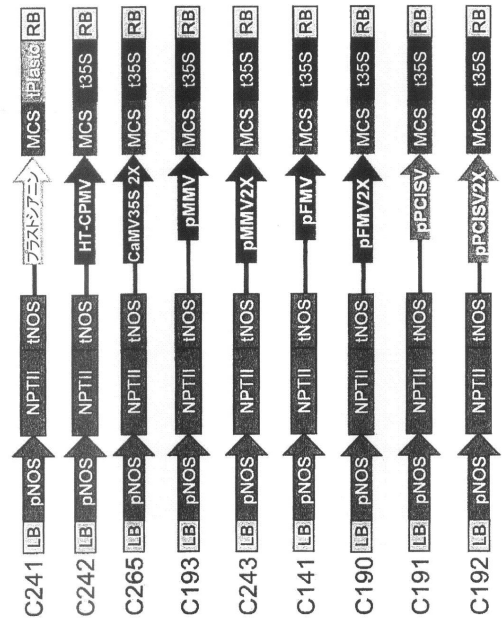


FIGURE 7

【配列表】

0006073247000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100156982

弁理士 秋澤 慈

(72)発明者 カンパノーニ プリスカ

スイス ツェーハー 1 4 2 3 ヴィラール ビュカン シュマン ド レグリーズ 1 0

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特表 2 0 0 3 - 5 0 9 0 2 7 (JP, A)

国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 9 5 1 6 (WO, A1)

特表 2 0 0 9 - 5 2 3 4 3 2 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 1 2 N 5 / 1 0

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

BIOSIS/MEDLINE/CAplus/REGISTRY (STN)