

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5995327号
(P5995327)

(45) 発行日 平成28年9月21日(2016.9.21)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int. Cl.		F I	
AO1H	1/00	(2006.01)	AO1H 1/00 A
C12P	21/00	(2006.01)	C12P 21/00 C
C12M	3/00	(2006.01)	C12M 3/00 Z
AO1H	5/00	(2006.01)	AO1H 5/00 A

請求項の数 29 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2013-520087 (P2013-520087)	(73) 特許権者	596060424
(86) (22) 出願日	平成23年7月15日 (2011.7.15)		フィリップ・モーリス・プロダクツ・ソシ
(65) 公表番号	特表2013-534430 (P2013-534430A)		エテ・アノニム
(43) 公表日	平成25年9月5日 (2013.9.5)		スイス国セアシュール 2000 ヌシャテル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/062180		、ケ、ジャンルノー 3
(87) 国際公開番号	W02012/007587	(74) 代理人	100092093
(87) 国際公開日	平成24年1月19日 (2012.1.19)		弁理士 辻居 幸一
審査請求日	平成26年7月15日 (2014.7.15)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	10169888.4		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成22年7月16日 (2010.7.16)	(74) 代理人	100067013
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 大塚 文昭
		(74) 代理人	100086771
			弁理士 西島 孝喜
		(74) 代理人	100109070
			弁理士 須田 洋之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物においてタンパク質を産生する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分を流体中に懸濁されたアグロバクテリウム (Agrobacterium) 細胞と接触させ、アグロバクテリウム細胞が対象となる異種ペプチドまたはタンパク質をコードする発現可能なコンストラクトを含む工程と；

b) 丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分およびアグロバクテリウム細胞を、該植物またはその部分の収容のために構成されたチャンバー並びにチャンバー中の空気および/または流体の圧力を調節して増加させるために構成された手段を含むシステム内で、2以上の陽圧サイクルのみにより処理し、それによってアグロバクテリウム細胞が丸のままの植物または植物部分にインフィルトレーションされる工程と

を含み、各サイクルで、少なくとも2.0 barの圧力が0.5秒～60秒の間維持される、

対象となる異種ペプチドまたはタンパク質を産生する方法。

【請求項2】

a) 丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分を流体中に懸濁したアグロバクテリウム細胞と接触させる工程と；

b) 丸のままの植物または丸のままの手を加えていない植物の部分およびアグロバクテリウム細胞を、該植物またはその部分の収容のために構成されたチャンバー並びにチャンバ

一中の空気および/または流体の圧力を調節して増加させるための手段を含むシステム内で、2以上の陽圧サイクルのみにより処理する工程と、
 を含み、各サイクルで、少なくとも2.0 barの圧力が0.5秒～60秒の期間の間維持される、
 丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分の中へアグロバクテリウム細胞をインフィルトレーションする方法。

【請求項3】

前記発現可能なコンストラクトが植物で発現可能なコンストラクトであり、対象となる異種ペプチドまたはタンパク質の一過性の発現を提供するように選択される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項4】

前記アグロバクテリウム細胞の懸濁物が少なくとも1.0のOD₆₀₀を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記チャンバーは、地上部および地中部を含む植物体全体がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸され、2以上の陽圧サイクルの間に適用される圧力にさらされるように構成される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記チャンバーは、植物の地上部のすべてまたは部分のみがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸されるが、植物の地上部に加えて地中部を含む植物全体が2以上の陽圧サイクルの間に適用される圧力にさらされるように構成される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項7】

前記チャンバーは、植物の地上部のすべてまたは部分がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸され、2以上の陽圧サイクルにおいて圧力に曝露されるように構成されるが、前記植物の地中部は、それらがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸されず、2以上の陽圧サイクルの間に適用される圧力にさらされないようにチャンバーの外部に配置される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記丸のままの植物または植物部分を処理する工程が、
a) 少なくとも3サイクル；または
b) 少なくとも4サイクル；または
c) 少なくとも8サイクル
 を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項9】

前記陽圧サイクルの少なくとも1つが、
 a) 少なくとも3.5 bar；または
 b) 少なくとも4.5 bar；または
 c) 少なくとも6.5 bar；または
 d) 少なくとも8 bar；または
 e) 少なくとも12 bar
 の圧力により丸のままの植物または植物部分を処理することを含み、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項10】

前記圧力が、
 a) 0.5秒/サイクル～10秒/サイクル；または
 b) 1秒/サイクル～5秒/サイクル；または
 c) 0.5秒/サイクル～1秒/サイクル
 の間で適用される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 1 1】

丸のままの植物または植物部分を処理する前記工程が、

- a) 少なくとも 0.5 秒 / サイクルで、少なくとも 8 bar の圧力で、少なくとも 2 サイクル；または
- b) 少なくとも 0.5 秒 / サイクルで、少なくとも 6 bar の圧力で、少なくとも 2 サイクル；または
- c) 少なくとも 1 秒 / サイクルで、少なくとも 4.5 bar の圧力で、少なくとも 8 サイクル

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

丸のままの植物または植物部分を処理する前記工程が、少なくとも 1 秒 / サイクルで、少なくとも 4.5 bar の圧力の、少なくとも 8 サイクルを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

丸のままの植物または植物部分をアグロバクテリウム細胞と接触させる前記工程が、

- a) 植物またはその部分をアグロバクテリウム細胞の懸濁物に漬け、懸濁物が少なくとも 2.5 の OD₆₀₀ を含む工程と、
- b) 植物またはその部分を少なくとも 2.5 の OD₆₀₀ を含むアグロバクテリウム細胞の懸濁物の使用によって生成されたエアゾールへ曝露する工程と

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記工程が、

- a) 封入されたチャンパー中のアグロバクテリウム細胞の懸濁物中に植物またはその部分を浸す工程と、
- b) 浸した植物またはその部分を含むアグロバクテリウム細胞の懸濁物へ液体の流体圧力を適用する工程と

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記植物が 8、9 または 10 の発育ステージのニコチアナ (*Nicotiana*) 属の種であり、該植物が 6.5 cm ~ 16.5 cm の間の平均長を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ニコチアナ属の種が、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 種である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記適用される陽圧サイクルのすべてが、大気圧と比較して増加した圧力を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

2 以上の陽圧サイクルを含む前記加圧処理は、丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分が細菌細胞懸濁物中に浸している間に適用される、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記複数の植物または植物部分が、流体中に懸濁したアグロバクテリウム細胞と接触されて 2 以上の陽圧サイクルにより処理される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

丸のままの植物または植物部分の収容のために構成されたチャンパー、流体中に懸濁されたアグロバクテリウム細胞、ならびにチャンパー中の空気および / または流体の圧力を調節して増加させるために構成された手段を含む、丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分の中へアグロバクテリウム細菌をインフィル

10

20

30

40

50

トレーションするためのおよび／または丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分において異種ペプチドまたはタンパク質を産生するためのシステムであって、

各サイクルで少なくとも2.0 barの圧力が0.5秒～60秒の間維持される、2以上の陽圧サイクルのみが適用されるように構成される、前記システム。

【請求項21】

コンプレッサーおよび減圧装置を含む、請求項20に記載のシステム。

【請求項22】

流体の流れを調節する、チャンバーの内部と外部との間の流体経路を提供するための複数の注入口、流出口および導管を含む、請求項20に記載のシステム。

10

【請求項23】

前記チャンバーが、内部において液体の霧化またはアエロゾル化のために形作られる複数のノズルを含む、請求項20または22のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項24】

前記チャンバーが、地上部および地中部を含む植物体全体がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸され、2以上の陽圧サイクルの間に適用される圧力にさらされるように構成される、請求項20～23のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項25】

前記チャンバーは、植物の地上部のすべてまたは部分のみがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸されるが、植物の地上部に加えて地中部を含む植物全体が2以上の陽圧サイクルの間に適用される圧力にさらされるように構成される、請求項20～23のいずれか一項に記載のシステム。

20

【請求項26】

前記チャンバーは、植物の地上部のすべてまたは部分がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸され、2以上の陽圧サイクルにおいて圧力に曝露されるように構成されるが、前記植物の地中部は、それらがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸されず、2以上の圧力サイクルの間に適用される圧力にさらされないようにチャンバーの外部に配置される、請求項20～23のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項27】

前記チャンバーが挿入または除去の間の植物の地上部の通過を可能にする1つまたは複数の開口部を含み、その開口部が弾性シールにより裏打ちされる、請求項26に記載のシステム。

30

【請求項28】

前記弾性シールが弾性の空気圧シールまたは水圧シールである、請求項27に記載のシステム。

【請求項29】

丸のままの植物もしくは植物部分の中へアグロバクテリウム細菌をインフィルトレーションするためのおよび／または丸のままの植物もしくは植物部分において異種ペプチドまたはタンパク質を産生するための請求項20～28のいずれか一項に記載のシステムの使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物において対象となるタンパク質（特に薬学的価値のあるタンパク質）を一過性に発現する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

組換えタンパク質の大規模産生は遺伝子導入植物の重要な応用である。多くの植物を組換えタンパク質の産生に成功裏に使用することができるが、短い期間内で実質的な量の組

50

換えタンパク質を産生する能力を有するシステムはほとんどない。

【0003】

植物細胞における一過性の遺伝子発現は、与えられたタンパク質の少量を産生する迅速手段として、および遺伝的コンストラクトの試験のために開発されている。植物細胞においてタンパク質を一過性に産生する方法は、例えば発現可能な様式で所望されるタンパク質の遺伝子コーディングを含む核酸分子のパーティクルガン送達、発現可能な遺伝子を含むバイナリーベクターのアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介性送達、プロトプラストの電気穿孔、および植物プロトプラストの中への裸のDNAのポリエチレングリコール媒介性送達を含む。パーティクルの砲撃は通常少数の細胞のみに到達し、DNAは転写が遂行されるべき細胞核に到達し、したがって一過性の発現にあまり能率的ではない。

10

【0004】

インフィルトレーション (アグロ - インフィルトレーション) によって送達されるアグロバクテリウムの使用は、有意に高い数の細胞へ外来遺伝子を送達することができる。一過性の発現のためのアグロバクテリウムインフィルトレーションのオリジナルのシステムは *Kapila et al., Plant Sci. 122: 101-108 (1997)* によって記載され、植物の組織の耐病性に有用と考えられるタンパク質の機能性についての迅速試験のために開発された。この応用については、植物組織全体がバイオアッセイにおいて使用できるので、タンパク質が精製または特徴づけられる必要はなかった。このシステムは薬学的に重要なタンパク質を発現するために後に使用された (*Vaquer* 20

20

【0005】

WO99/48355は、(a) 植物の組織を感染性形質転換ベクター (アグロバクテリウム等) を含む培地中で浸漬する工程と; (b) 該組織に対する圧力を -10 ~ -100 kPa ゲージへ低下させる工程と; (c) 該圧力を 10 ~ 60 分間の間維持する工程と、(d) 該圧力を大気圧以上に上昇させて、植物の組織または細胞のゲノムの中へ形質転換ベクターが組込まれた該植物細胞または組織を同定する選択を形質転換ベクターにより可能にする工程とを含む植物の形質転換の方法を開示する。植物材料は圧力低下および圧力上昇の交互のサイクルにさらされることがさらに開示され、そこで圧力は 10 ~ 500 30

30

【0006】

EP1662002は、植物材料を調製すること、所望される導入遺伝子を含むベクターを保有するアグロバクテリウムにより植物材料を感染することを含むアグロバクテリウム媒介性遺伝子形質導入および形質転換のための方法を開示する。それは、植物材料を調製するプロセスの間または調製後であるがアグロバクテリアによる感染前に植物材料を加圧する方法のさらに一部分である。

【0007】

WO01/12828は、真空チャンバー、真空を生成するための手段および真空生成手段と真空チャンバーとの間のコネクターを含む装置、ならびにさらに真空チャンバーの内部に植物を添付または支持するための手段を記載する。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開99/48355号

【特許文献2】欧州特許出願公開第1662002号

【特許文献3】国際公開01/12828号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

50

短い期間内で工業規模で実質的な量の組換えタンパク質（例えばパンデミック発生または新たな疾患の予防のためのサブユニットワクチン等）を産生することができるシステムおよび方法のための必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明はこの必要性を満たす手段および方法を提供する。特に、本発明は、
 (i) 丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分）を、流体中に懸濁したアグロバクテリウム細胞と接触させ、アグロバクテリウム細胞が対象となる異種ペプチドまたはタンパク質をコードする発現可能な（特に植物で発現可能な）コンストラクトを含む工程と；

(ii) 該植物もしくは植物部分または複数の植物もしくは植物部分およびアグロバクテリウム細胞を1つまたは複数の圧力サイクルにより処理し、それによってアグロバクテリウム細胞が丸のままの植物または植物部分にインフィルトレーションされる工程と

を含み、
 発現可能なコンストラクトが対象となる異種ペプチドまたはタンパク質の一過性の発現を提供するように選択され、圧力サイクルの少なくとも1つが大気圧と比較して増加した圧力を含む、

対象となる異種ペプチドまたはタンパク質を産生する方法を一実施形態において提供する。本発明の特定の実施形態において、植物は1つまたは複数の圧力サイクルにより処理され、それらはすべて大気圧と比較して増加した圧力を含む。特定の実施形態において、1つのサイクルあたりの圧力は0.5秒～60秒の間維持される。

【0011】

一実施形態において、本発明は、

(i) 丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分）を、流体中に懸濁したアグロバクテリウム細胞と接触させる工程と；

(ii) 該植物もしくは植物部分または複数の植物もしくは植物部分およびアグロバクテリウム細胞を1つまたは複数の圧力サイクルにより処理する工程と

を含み、
 発現可能なコンストラクトが対象となる異種ペプチドまたはタンパク質の一過性の発現を提供するように選択され、圧力サイクルの少なくとも1つが大気圧と比較して増加した圧力を含む、

植物もしくは植物部分または複数の植物もしくは植物部分の中へアグロバクテリアをインフィルトレーションする方法を提供する。本発明の特定の実施形態において、植物は1つまたは複数の圧力サイクルにより処理され、それらはすべて大気圧と比較して増加した圧力を含む。特定の実施形態において、1つのサイクルあたりの圧力は0.5秒～60秒の間維持される。

【0012】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分）およびアグロバクテリウム細胞は、閉じたシステム（特に丸のままの植物、特に丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分の収容のために構成されたチャンバーおよびチャンパー中の空気および/または流体の圧力を調節して増加させるための手段を含むシステム）内で、1つまたは複数の圧力サイクルにより処理される。

【0013】

本発明の一実施形態において、チャンパーは、地上部および地中部を含む植物体全体がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水され、1つまたは複

10

20

30

40

50

数の圧力サイクルの間に適用される圧力にさらされるように構成される。

【0014】

本発明の別の実施形態において、チャンバーは、植物の地上部のすべてまたは部分のみがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水されるが、植物の地上部に加えて地中部を含む植物全体が1つまたは複数の圧力サイクルの間に適用される圧力にさらされるように構成される。

【0015】

本発明のさらに他の実施形態において、チャンバーは、植物の地上部のすべてまたは部分がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水され、1つまたは複数の圧力サイクルにおいて圧力に曝露されるように構成されるが、植物の地中部（特に植物根）は、それらがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水されず、1つまたは複数の圧力サイクルの間に適用される圧力にさらされないようにチャンバーの外部に配置される。

10

【0016】

本発明の一実施形態において、1つまたは複数の圧力サイクルを含む加圧処理は、丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分が細菌細胞懸濁液中のアグロバクテリウム細胞に接している間に、該植物または植物部分に適用される。

【0017】

本発明の一実施形態において、アグロバクテリウム細胞の懸濁物は、少なくとも1.0の、特に少なくとも1.5の、特に少なくとも2.0の、特に少なくとも2.5の、特に少なくとも3.0の、特に少なくとも3.5の、特に少なくとも4.0の、特に少なくとも4.5のOD600を含む。

20

【0018】

本発明の一実施形態において、圧力サイクルの少なくとも1つは、植物全体（特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分）が、大気圧と比較して増加した圧力にさらされること、特に丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分が、少なくとも0.5 bar、特に少なくとも1.0 bar、特に少なくとも1.5 bar、特に少なくとも2.0 bar、特に少なくとも2.5 bar、特に少なくとも3.0 bar、特に少なくとも3.5 bar、特に少なくとも4.0 bar、特に少なくとも4.5 bar、特に少なくとも5.0 bar、特に少なくとも5.5 bar、特に少なくとも6.0 bar、特に少なくとも7.0 bar、特に少なくとも8.0 bar、特に少なくとも9.0 bar、特に少なくとも10.0 bar、特に少なくとも11.0 bar、および特に少なくとも12.0 barの圧力にさらされることを含む。

30

【0019】

植物を損傷せずに植物または植物部分の中への細菌懸濁液の最大のインフィルトレーションを可能にする最適な圧力は、インフィルトレーション法において使用される、植物種に依存してそして与えられた植物種内で変動し、多様性にも依存して変動する。実施例において本明細書で開示されるように、試験システムを使用することによって当業者は最適な圧力条件を容易に決定することができる。

40

【0020】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分）を処理する工程は、少なくとも2サイクル、特に少なくとも3サイクル、特に少なくとも4サイクル、特に少なくとも5サイクル、特に少なくとも6サイクル、特に少なくとも7サイクル、特に少なくとも8サイクル、特に少なくとも9サイクル、特に少なくとも10サイクル、特に少なくとも11サイクルを含み、該サイクルの少なくとも1つまたは特定の実施形態においてすべての該

50

サイクルは、少なくとも0.5 bar、特に少なくとも1.0 bar、特に少なくとも1.5 bar、特に少なくとも2.0 bar、特に少なくとも2.5 bar、特に少なくとも3.0 bar、特に少なくとも3.5 bar、特に少なくとも4.0 bar、特に少なくとも4.5 bar、特に少なくとも5.0 bar、特に少なくとも5.5 bar、特に少なくとも6.0 barの圧力で、少なくとも0.1秒/サイクル、特に少なくとも0.2秒/サイクル、特に少なくとも0.3秒/サイクル、特に少なくとも0.4秒/サイクル、特に少なくとも0.5秒/サイクル、特に少なくとも1秒/サイクル、特に少なくとも1.5秒/サイクル、特に少なくとも2.0秒/サイクル、特に少なくとも2.5秒/サイクル、特に少なくとも3.0秒/サイクル、特に少なくとも3.5秒/サイクル、特に少なくとも5.0秒/サイクルを含む。

10

【0021】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理する工程は、少なくとも2サイクルを含む。

【0022】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理する工程は、少なくとも4サイクルを含む。

【0023】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理する工程は、少なくとも5サイクルを含む。

【0024】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理する工程は、少なくとも6サイクルを含む。

20

【0025】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理する工程は、少なくとも7サイクルを含む。

【0026】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理する工程は、少なくとも8サイクルを含む。

【0027】

本発明の一実施形態において、圧力サイクルの少なくとも1つは、少なくとも2.5 barの圧力により丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理することを含む。

30

【0028】

本発明の一実施形態において、圧力サイクルの少なくとも1つは、少なくとも3.5 barの圧力により丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理することを含む。

【0029】

本発明の一実施形態において、圧力サイクルの少なくとも1つは、少なくとも4.5 barの圧力により丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理することを含む。

40

【0030】

本発明の一実施形態において、圧力サイクルの少なくとも1つは、少なくとも6 barの圧力により丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理することを含む。

【0031】

本発明の一実施形態において、圧力サイクルの少なくとも1つは、少なくとも8 barの圧力により丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分処理することを含む。

【0032】

本発明の一実施形態において、圧力サイクルの少なくとも1つは、少なくとも12 bar

50

rの圧力により丸のままの植物もしくは複数の丸のままの植物または植物部分もしくは複数の植物部分を処理することを含む。

【0033】

本発明の一実施形態において、圧力は0.5秒/サイクル~10秒/サイクルの間で適用される。

【0034】

本発明の一実施形態において、圧力は1秒/サイクル~5秒/サイクルの間で適用される。

【0035】

本発明の一実施形態において、圧力は0.5秒/サイクル~1秒/サイクルの間で適用される。

10

【0036】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物(特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分)を、大気圧と比較して増加した圧力により処理する工程は、少なくとも0.5秒/サイクルで、少なくとも3.0barの圧力で、少なくとも5サイクルを含む。

【0037】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物(特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分)を、大気圧と比較して増加した圧力により処理する工程は、少なくとも1秒/サイクルで、少なくとも4.5barの圧力で、少なくとも8サイクルを含む。

20

【0038】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物(特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分)を、大気圧と比較して増加した圧力により処理する工程は、少なくとも0.5秒/サイクルで、少なくとも8.0barの圧力で、少なくとも1サイクルを含む。

【0039】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物(特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分)を、大気圧と比較して増加した圧力により処理する工程は、少なくとも0.5秒/サイクルで、少なくとも6.0barの圧力で、少なくとも2サイクルを含む。

30

【0040】

本発明の一実施形態において、丸のままの植物(特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分)をアグロバクテリウム細胞と接触させる工程は、(i)植物またはその部分をアグロバクテリウム細胞の懸濁物に漬け、懸濁物が少なくとも1.0、特に少なくとも1.5、特に少なくとも2.0、特に少なくとも2.5、特に少なくとも3.0、特に少なくとも3.5、特に少なくとも4.0、特に少なくとも4.5のOD600を含む工程と、(ii)植物またはその部分を少なくとも1.0、特に少なくとも1.5、特に少なくとも2.0、特に少なくとも2.5、特に少なくとも3.0、特に少なくとも3.5、特に少なくとも4.0、特に少なくとも4.5のOD600を含むアグロバクテリウム細胞の懸濁物の使用によって生成されたエアゾールへ曝露する工程とを含む。

40

【0041】

本発明の一実施形態において、植物は8、9または10の発育ステージのニコチアナ属(Nicotiana)の種(特にニコチアナ・タバカム(tabacum)種)である

50

【 0 0 4 2 】

一実施形態において、本発明は、丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または植物の部分）の収容のために構成されたチャンバーならびにチャンバー中の空気および/または流体の圧力を調節して増加させるために構成された手段を含む、丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分または複数の丸のままの手を加えていない植物もしくは丸のままの手を加えていない植物の部分）の中へアグロバクテリアをインフィルトレーションするためのおよび/または異種ペプチドまたはタンパク質を産生するためのシステムを提供する。

【 0 0 4 3 】

本発明の一実施形態において、システムはコンプレッサーおよび減圧装置を含む。

【 0 0 4 4 】

本発明の一実施形態において、システムは、流体の流れを調節する、チャンバーの内部と外部との間の流体経路を提供するための複数の注入口、流出口および導管を含む。

【 0 0 4 5 】

本発明の一実施形態において、チャンバーは、内部において液体の霧化またはアエロゾル化のために形作られる複数のノズルを含む。

【 0 0 4 6 】

本発明の一実施形態において、チャンバーは、地上部および地中部を含む植物体全体がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水され、1つまたは複数の圧力サイクルの間に適用される圧力にさらされるように構成される。

【 0 0 4 7 】

本発明の一実施形態において、チャンバーは、植物の地上部のすべてまたは部分のみがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水されるが、植物の地上部に加えて地中部を含む植物全体が1つまたは複数の圧力サイクルの間に適用される圧力にさらされるように構成される。

【 0 0 4 8 】

本発明の一実施形態において、チャンバーは、植物の地上部のすべてまたは部分がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水され、1つまたは複数の圧力サイクルにおいて圧力に曝露されるように構成されるが、植物の地中部（特に植物根）は、それらがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水されず、1つまたは複数の圧力サイクルの間に適用される圧力にさらされないようにチャンバーの外部に配置される。

【 0 0 4 9 】

本発明の一実施形態において、チャンバーは挿入または除去の間の植物の地上部の通過を可能にする1つまたは複数の開口部を含み、その開口部は弾性シール（特に弾性の空気圧シールまたは水圧シール）により裏打ちされる。

【 0 0 5 0 】

一実施形態において、本発明は、丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物もしくは植物の部分）の中へアグロバクテリウム細菌をインフィルトレーションするためおよび/または異種ペプチドまたはタンパク質を産生するための、本発明に記載のおよび本明細書において記載されるようなシステムの使用に関する。

【 0 0 5 1 】

定義

【 0 0 5 2 】

本出願の範囲内で使用される専門的な用語および表現は、概して植物生物学の関連技術において一般に適用される意味が与えられるべきである。

【 0 0 5 3 】

以下の用語の定義はすべて本出願の全部の内容へ適用される。単語「含むこと」は他のエレメントまたは工程を除外せず、不定冠詞「1つの(a)」または「1つの(an)」

10

20

30

40

50

は複数を除外しない。単工程は請求項中に列挙された複数の特徴の機能を満たすことができる。特に属性または値に関連する「本質的に」、「約」、「近似的に」という用語および同種のもは、正確な属性または正確な値もそれぞれ定義する。「約」という用語は、与えられた数の値または範囲の文脈において、与えられた値または範囲の20%内、10%内、5%内、または2%内にある値または範囲を指す。

【0054】

本発明内で使用される時「植物」は、手を加えていない植物、実質的に手を加えていない植物、または複数の手を加えていないかもしくは実質的に手を加えていない植物；丸のままの植物、実質的に丸のままの植物、または複数の丸のままかもしくは実質的に丸のまま植物、およびその任意の発育ステージのその子孫を指す。本出願の目的のために、手を加えていない植物は、本質的に手を加えずに閉じられた脈管系（それは傷害または病巣に起因した管の流体の排出を示さない）を含む植物を指すと理解される。

10

【0055】

本発明内で使用される時「植物部分」は、切り枝、植物器官、植物組織または植物細胞を含む、植物のいずれかの部分を指し、その植物部分は、植物の分離された部分または丸のままの手を加えていない植物の部分であり得る。

【0056】

「丸のままの手を加えていない植物の部分」は、たとえ分離してインフィルトレーションしたとしても、植物の残りの部分が、手を加えていない植物の手を加えていない閉じられた脈管系へと完全に一体化される脈管系を備えた植物の機能的コンポーネントとして提供される植物部分を指すことが意味される。

20

【0057】

本発明内で使用される時「植物細胞」は、花粉、胚珠および接合子を含む植物の構造的単位および生理的単位を指す。植物細胞は、細胞壁のないプロトプラスト、分離された単一細胞、培養された細胞またはより高度に組織化された単位（丸のままの手を加えていない植物を含む、植物の組織、植物器官または丸のままの植物等であるがこれらに限定されない）の部分としての細胞の形態であり得る。

【0058】

本明細書において使用される時「植物組織」は、構造的単位または機能的単位へと組織化される複数の植物細胞を意味する。これは植物体または培養における植物の任意の組織を含む。

30

【0059】

本明細書において使用される時「植物器官」は、植物の別個の部分または分化した部分（根、茎、葉、花、花部分、花芽、胚、種子または果物等であるが、これらに限定されない）を指す。これは植物体または培養における植物の任意の器官を含む。

【0060】

本発明内で使用される時「植物材料」は、葉、茎、根、花または花部、果物、花粉、胚珠、接合子、種子、切り枝および植物の任意の他の部分を含む、植物体または培養のいずれかにおける、植物、その組織および器官から得ることができる分泌物または抽出物を含むが、これらに限定されない任意の固体、液体または、ガスの組成物、またはその組み合わせを指す。

40

【0061】

本発明内で使用される時「植物細胞培養」は、植物細胞の培養（プロトプラスト、細胞培養細胞、培養された植物の組織における細胞、外植体における細胞および花粉培養等であるが、これらに限定されない）を包含する。

【0062】

本発明内で使用される時「タバコ植物」は、ニコチアナ・タバカム（またはN・タバカム）を含むがこれらに限定されないニコチアナ属に属する種の植物を指す。本発明の特定の実施形態は、ニコチアナ・タバカムを特定せずに「タバコ植物」という用語を使用して本明細書において記載し、かかる記述はニコチアナ・タバカムを特異的に含むと解釈され

50

る。

【0063】

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書においてクレオチドのポリマー（非修飾または修飾されたデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）であり得る）を指すとして使用される。したがって、ポリヌクレオチドは、限定されずにゲノムDNA、相補DNA（cDNA）、mRNAまたはアンチセンスRNAであり得る。さらに、ポリヌクレオチドは、一本鎖もしくは二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子、または一本鎖および二本鎖領域の混合物を備えたハイブリッド分子であり得る。加えて、ポリヌクレオチドはDNA、RNAまたは両方を含む三本鎖領域からなることができる。ポリヌクレオチドは1つまたは複数の修飾塩基（ホスホチオエート等）を含むことができ、ペプチド核酸（PNA）であり得る。概して、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もしくは個々のヌクレオチドの単離またはクローン化された断片、または前述のものの組み合わせから組み立てることができる。

10

【0064】

「ヌクレオチド配列」という用語は、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを含むがこれらに限定されないヌクレオチドのポリマーの塩基配列を指す。

【0065】

本明細書において使用される時「遺伝子配列」という用語は、ポリペプチドまたは生物学的に活性のあるRNAをコードする核酸分子またはポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を指し、タンパク質の断片のみをコードする部分的な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、コード配列と比較して上流または下流に位置する遺伝子発現に対して調節機能を有する配列、および遺伝子のイントロン配列も含むことができる。

20

【0066】

「プロモーター」という用語は、遺伝子の転写の開始を指令する遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列を指す。概して、プロモーター配列はそれが作動可能に連結される遺伝子の発現を駆動するのに必要であるが必ずしも十分だとは限らない。発現可能な遺伝子コンストラクトのデザインにおいて、遺伝子は、プロモーターに十分接近してそしてプロモーターに対して好適な方向で、遺伝子の発現がプロモーター配列によって制御されるように置かれる。プロモーターは、遺伝子に対して上流におよびその天然の設定におけるプロモーターとそれが制御する遺伝子の間の距離に近似する転写開始部位からの距離で優先的に配置される。当該技術分野において公知のように、この距離の若干の変動はプロモーター機能の喪失なしに許容することができる。本明細書において使用される時「作動可能に連結された」という用語は、そのコーディング領域の転写がそのプロモーターによって制御され調節されるような方法で、プロモーターがコーディング領域に連結されることを意味する。プロモーターをコーディング領域へ作動可能に連結するための手段は当該技術分野において周知である。

30

【0067】

本明細書において使用される時「発現制御配列」はプロモーターを含み、1つまたは複数のエンハンサー配列、転写終結配列、ポリアデニル化配列、3'または5'非翻訳配列、イントロン性配列、リボソーム結合部位、および植物細胞中の遺伝子の発現を安定化するか他の方法で制御し得る他の配列を含み得るが、これらに限定されない。発現制御配列は、内在性（すなわち植物宿主において天然に見出される）または外来性（植物宿主において天然に見出されない）であり得る。外来性発現配列は、選択された条件下で植物細胞において機能的である限り、植物配列であってもなくてもよい。

40

【0068】

「異種遺伝子」または「異種コード配列」は、形質転換または処理される予定の植物に対して外来性であるかまたはこれらの植物において天然に見出されず、「異種ポリペプチド」または生物学的に活性のあるその断片をコードする遺伝子またはコード配列を指す。異種遺伝子配列は、ウイルス配列、原核生物配列および真核生物配列を含む。原核生物コ

50

ード配列は、微生物配列、細菌配列またはウイルス配列（例えばワクチンとして投与され得る抗原の産生のための）を含むが、これらに限定されない。真核生物コード配列は哺乳類配列またはヒト配列を含むが、リーダー配列または分泌シグナル配列、標的化配列、および同種のものを含むがこれらに限定されない非哺乳動物（さらに他の植物）からの配列も含むことができる。1つの好ましい態様において、異種遺伝子核酸はヒトタンパク質をコードする。

【0069】

「異種遺伝子」または「異種コード配列」という用語は、天然に存在する配列、突然変異した配列、バリエーション配列、化学的に合成された配列、ゲノム配列、cDNA配列またはかかる配列の任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない。「遺伝子」への参照は、生物学的に活性のあるタンパク質をコードする全長遺伝子またはその断片を包含する。本明細書において使用される時「異種ペプチド」または「異種タンパク質」という用語は、上で定義されるような「異種遺伝子」または「異種コード配列」から発現される、オリゴペプチドおよびポリペプチドまたはタンパク質を含むペプチドを指す。したがって、植物において産生された「異種ペプチド」または「異種タンパク質」は、植物に対して外来性であるかまたはこれらに植物において天然に見出されない。「異種ペプチド」または「異種タンパク質」は、哺乳類またはヒトのペプチドまたはタンパク質であり得る。「異種ペプチド」または「異種タンパク質」は、それがバリエーションであるか、または植物ペプチドもしくはタンパク質から突然変異されるか、または産生している植物種、系統もしくは品種において天然に見出されないペプチドまたはタンパク質であるならば、植物ペプチドまたはタンパク質であり得る。

【0070】

本明細書において使用される時「T-DNA境界」は、アグロバクテリウム株（*A. tumefaciens*）株もしくは*A. rhizogenes*株またはその修飾もしくは突然変異した形態等の病原性遺伝子産物によって認識することができる約25ヌクレオチド長の配列を含み、連結されるDNA配列の真核細胞（好ましくは植物細胞）への移行に十分であるDNA断片を指す。この定義は、野生型Tiプラスミドからの天然に存在するT-DNA境界すべてに加えてその任意の機能的誘導体を含むがこれらに限定されず、化学的に合成されたT-DNA境界を含む。一態様において、本発明に記載の発現コンストラクトのコード配列および発現制御配列は、2つのT-DNA境界の間に位置する。

【0071】

「一過性の発現を提供するように選択される」という用語は、植物における一過性の遺伝子発現のために、特に安定した形質転換に必要な従来のバイナリーベクターのエレメント（形質転換選択遺伝子等）の除去によって、特異的にデザインされた発現コンストラクトを指す（例えばRP Hellens et al, *Plant Methods* 2005, 1:13を参照されたい）。

【0072】

本明細書において使用される時「界面活性剤」という用語は疎水性部分および親水性部分を一般的に含む界面活性剤を指す（例えば、Bhairi, *A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biological Systems*, Calbiochem-Novabiochem Corp. 1997を参照されたい）。

【0073】

界面活性剤は、1つまたは複数の荷電基を含むかどうかによって依存して、陰イオン性、非イオン性、両性イオン性または陽イオン性として分類することができる。陰イオン性界面活性剤は負に荷電した基を含んでおり、正味の負電荷を有する。非イオン性界面活性剤は荷電していない極性基を含んでおり、電荷を持たない。これらの界面活性剤は、一般的にアルキルフェノールまたは第一級アルコールもしくは第二級アルコールとアルキレンオキシドの反応生産物であるか、またはアミノオキシド、ホスフィンオキシドまたはジアルキル

10

20

30

40

50

スルホキッドである。

【 0 0 7 4 】

例えば、WO / 2 0 0 5 / 0 7 6 7 6 6 中で植物インフィルトレーションシステムにおいて好適に使用することができる界面活性剤を開示する。

【 0 0 7 5 】

特に、例示的な非イオン性界面活性剤は、t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (トリトン X - 1 0 0)、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (ツイーン 2 0)、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (ツイーン 2 1)、モノパルミチン酸ポリオキシエチレンソルビタン (ツイーン 4 0)、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (ツイーン 6 0)、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (ツイーン 8 0)、トリオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (ツイーン 8 5)、(オクチルフェノキシ)ポリエトキシエタノール (IGEPA L C A - 6 3 0 / N P - 4 0)、トリエチレングリコールモノラウリルエーテル (ブリジ 3 0)、およびモノラウリン酸ソルビタン (スパン 2 0) を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 7 6 】

両性イオン性界面活性剤は正に荷電した基および負に荷電した基の両方を含んでおり、正味電荷を持たない。好適な両性イオン性界面活性剤は、ベタイン (カルボキシベタイン等)、スルホベタイン (スルタインとしても公知である)、アミドベタインおよびスルホアミドベタイン (かかるものは C 8 - C 1 8、好ましくは C 1 0 - C 1 8 を含む得る)、アルキルベタイン、スルホベタイン、アミドベタインおよびスルホアミドベタイン、例えば、ラウリルアミドプロピルベタイン (L A B) タイプベタイン、n - アルキルジメチルアンモニオメタンカルボキシラート (D A M C)、n - アルキルジメチルアンモニオエタンカルボキシラート (D A E C) および n - アルキルジメチルアンモニオプロパンカルボキシラート (D A P C)、n - アルキルスルタイン、n - アルキルジメチルアンモニオアルキルスルホナート、N - アルキルジメチルアンモニオエタンスルホナート (D A E S)、n - アルキルジメチルアンモニオプロパンスルホナート (D A P S) および n - アルキルジメチルアンモニオブタンスルホナート (D A B S)、ヘキサデシルジメチルアンモニオプロパンスルホナート、n - アルキルアミドメタンジメチルアンモニオメタンカルボキシラート、n - アルキルアミドメタンジメチルアンモニオエタンカルボキシラート、ラウリルアミドプロピルベタイン (L A B)、n - アルキルアミドメタンジメチルアンモニオメタンスルホナート、n - アルキルアミドエタンジメチルアンモニオエタンスルホナートおよび n - アルキルアミドプロパンジメチルアンモニオプロパンスルホナート、3 - [(3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホナート (C H A P S)、および 3 - [(3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホナート (C H A P S O)、リン脂質 (例えば、ホスファチジルエタノールアミンホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ジアシルフォスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾフォスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロール、リゾフォスファチジルイノシトール)、飽和脂肪酸誘導体および不飽和脂肪酸誘導体 (例えばエチルエステル、プロピルエステル、コレステロールエステル、補酵素 A エステル、ニトロフェニルエステル、ナフチルエステル、モノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリド、脂肪アルコール、脂肪アルコールアセテートならびに同種のもの)、リポポリサッカライド、糖脂質およびスフィンゴ脂質 (例えばセラミド、セラブロシド、ガラクトシルジグリセリド、ガングリオシド、ラクトセラブロシド、リゾスルファチドおよび同種のもの) を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 7 7 】

「陽イオン性界面活性剤」はインフィルトレーションの条件下で正に荷電した基を有する。好適な陽イオン性界面活性剤は、第四級アミンまたは第三級アミンを含むが、これらに限定されない。例示的な第四級アミン界面活性剤は、塩化セチルピリジニウム、臭化セチルトリメチルアミン (C T A B ; C a l b i o c h e m # B 2 2 6 3 3 または A l d

10

20

30

40

50

rich & num; 85582 - 0)、塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTAC 1; Aldrich & num; 29273 - 7)、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム (DTAB、Sigma & num; D - 8638)、塩化ドデシルトリメチルアンモニウム (DTACI)、臭化オクチルトリメチルアンモニウム、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム (TTAB)、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム (TTACI)、臭化ドデシルエチルジメチルアンモニウム (DEDTAB)、臭化デシルトリメチルアンモニウム (D10TAB)、臭化ドデシルトリフェニルホスホニウム (DTPB)、臭化オクタデシルイルトリメチルアンモニウム、塩化ステアラルコニウム、塩化オレアルコニウム、塩化セトリモニウム、アルキルトリメチルアンモニウムメトスルファート、塩化パルミトアミドプロピルトリメチル、クオタニウム84 (Mackernium NLE; McIntyre Group, Ltd.、および小麦脂質エポキシド (Mackernium WLE; McIntyre Group, Ltd.)) を含むが、これらに限定されない。

10

【0078】

例示的な第三級アミン界面活性剤は、オクチルジメチルアミン、デシルジメチルアミン、ドデシルジメチルアミン、テトラデシルジメチルアミン、ヘキサデシルジメチルアミン、オクチルデシルジメチルアミン、オクチルデシルメチルアミン、ジデシルメチルアミン、ドデシルメチルアミン、塩化トリアセチルアンモニウム、塩化セトリモニウムおよびアルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライドを含むが、これらに限定されない。陽イオン性界面活性剤の追加のクラスは、ホスホニウム、イミダゾリンおよびエチル化アミン

20

【0079】

陰イオン性界面活性剤は、一般的に有機硫酸塩および有機スルホン酸塩の水溶性アルカリ金属塩である。これらは、ラウリン酸カリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、アルキルポリオキシエチレンスルファート、アルギン酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム、フォスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシン、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸およびそれらの塩、グリセリルエステル、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、コール酸および他の胆汁酸 (例えば、コール酸、デオキシコール酸、グリココール酸、タウロコール酸、グリコデオキシコール酸) ならびにその塩 (例えば、デオキシコール酸ナトリウムなど) を含むが、これらに限定されない。

30

【0080】

短鎖アルコール (エタノール、1 - プロパノールおよび1 - ブタノール等) などの共界面活性剤を加えて使用することができる。

【0081】

上記の界面活性剤のいずれかの組み合わせを使用することができる。具体的に上でリストされない界面活性剤も本発明の範囲内にさらに包含される。

【0082】

使用された界面活性剤の量は、界面活性剤のタイプおよび処理される植物の組織 (すなわちワックスで覆われた葉の表面の厚みなど) に応じて変動するだろう。

40

【0083】

一般的に、界面活性剤は、アグロバクテリウム懸濁物の体積の0.005% ~ 約1%にわたる濃度で使用される。好ましくは0.005% ~ 約0.5%、より好ましくは約0.005% ~ 約0.05%の濃度範囲である。一般的に、より低いレベルのイオン性界面活性剤が非イオン性界面活性剤よりも使用されるだろう。

【0084】

本明細書において使用される時「バキュームインフィルトレーション」という用語は、細胞間または間質腔の中へ病原菌 (例えばアグロバクテリウム) の浸透を可能にする方法および植物と病原菌との間の相互作用を研究する方法に関する。物理的に、真空は、植物の組織における細胞の間の空気空間を減少させる陰性の大気圧を生成する。継続期間が長

50

いほどおよび真空の圧力が低いほど、植物の組織内の空気空間は少ない。増加した圧力により、インフィルトレーション培地（感染性形質転換ベクターを含む）が植物の組織の中へ移動することが可能になる。植物形質転換のために、アグロバクテリウムの存在下において植物部分に一定の期間で真空を適用することができる。

【 0 0 8 5 】

本明細書において使用される時「大気圧」という用語は、地球大気においてその表面より上の空気の重さによって表面に対してかけられる単位面積あたりの力を定義する。圧力は、単位面積あたりの表面上にかけられる力（または重さ）であり、パスカル（Pa）で測定される。キログラム質量によって表面上にかけられる圧力は9.8 Paに等しい。全大気によって地球表面上にかけられる圧力は約100,000 Paである。通常、大気圧はミリバール（mb）で示される。1 mbは100 Paと等しく、したがって標準大気圧は約1000 mbである。実際、大気圧の実際の値は場所、高度および天候に依存して変動する。海面で、一般的には観測値は970 mb ~ 1040 mbの範囲にわたる。圧力が高度とともに減少するので、様々な場所で観察された圧力を同じレベル（通常海面）に調節しなければならない。

10

【 0 0 8 6 】

閉じた容器中で封入された流体上に静止してかけられた圧力は、流体のすべての部分および容器の壁に損失なしに伝達される。静止流体については、その中の2つのポイントの間の圧力の差異は、流体の密度および2ポイントの間の深さの差異のみに依存する。したがって、流体はその中に浸漬されたすべての物体上に圧力をかけ、それは外部から適用される流体の上部への圧力プラス液体の重さからの静止流体圧力と等しい。

20

【 0 0 8 7 】

特別に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と意味を有する。当業者に公知の様々な方法論が本明細書において参照される。参照されたかかる公知の方法論を説明する出版物および他の材料は、それらの全体の参照によって完全に説明されるかのように本明細書に援用される。本発明の実行は、特別の指示の無い限り、化学、分子生物学、微生物学および植物生物学の従来技法を用い、これらは当該技術分野の技術内である。

【 0 0 8 8 】

当業者に公知の任意の好適な材料および/または方法を本発明の実行において利用することができるが、好ましい材料および/または方法が記載される。以下の記述および実施例において参照される材料、試薬および同種のは、特に断りのない限り商業的供給源から得ることができる。

30

【 0 0 8 9 】

本発明は、植物において一過性に、対象となるペプチドおよび/またはタンパク質の発現のための、特に薬学的に価値のあるペプチドおよび/またはタンパク質の発現のための、システムおよび方法に関する。特に、本発明は、丸のままの手を加えていない植物、または複数の丸のままの植物、または植物体における植物器官または組織を含む丸のままの手を加えていない植物の部分の中へアグロバクテリウム細胞を導入する改善された方法を提供する。本発明の方法は、他の方法によって得られたものよりも高い組換えタンパク質の収率をもたらす、多くの植物の単独または同時の効果的なアグロインフィルトレーションを提供する。方法は容易にスケールの変更および自動化することでき、組換えタンパク質の需要の変化を満たす。

40

【 0 0 9 0 】

植物のアグロインフィルトレーションはこれらの2つの方法のうちの1つに従って現在実行されている。

【 0 0 9 1 】

第1の方法は、アグロバクテリウム細胞の懸濁物により充填された注射器を使用し、細菌を個々の葉に注入する。注射器を葉の下側に配置し、細菌懸濁物が葉の全体にわたって広がるようにプランジャーを穏やかに押し出す。この方法は労力を要し、スケールアップ

50

に適用可能ではない。

【 0 0 9 2 】

第2の方法は植物による細菌の取り込みを支援するために真空を使用することを含む。典型的には、植物をチャンバーの内部に上下逆さまで置き、葉を細菌懸濁液の中に完全に浸漬する。チャンバー中の圧力を約10分の数ミリバールにする。最初に空気を真空まで葉から引き抜き、空気を再導入するときに、葉は液体を引き込む。真空プロセスは少なくとも2つの短所を有し、望ましい低圧力まで圧力を導くのに数分間かかるので遅い。真空はインフィルトレーションした植物に対して特定の無視できないストレスを生成し、それはインフィルトレーションプロセスからの回復または生存が困難な植物をもたらす。

【 0 0 9 3 】

一態様において、本発明は、丸のままの植物または複数の丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または植物体における植物器官または植物組織を含む丸のままの手を加えていない植物の部分）の中へアグロバクテリウム細胞を導入する改善された方法を提供する。本発明の方法は、真空または陰圧を使用する当該技術分野において公知の方法とは異なり、陽性の流体圧力または陽性および陰性の流体圧力の組み合わせを与え、アグロバクテリウム細胞が、丸のままの植物または複数の丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または植物体における植物器官または植物組織を含む丸のままの手を加えていない植物の部分）にインフィルトレーションすることを促進する。本発明は、アグロバクテリウム細胞と接触されるかまたは接触されてきた、丸のままの植物または複数の丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または植物体における植物器官または植物組織を含む丸のままの手を加えていない植物の部分）に陽性の流体圧力を送達するためのシステムおよび手段も提供する。

【 0 0 9 4 】

本発明に従えば、丸のままの植物または複数の丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分）および細菌が閉鎖条件下で1つまたは複数の圧力サイクルによる処理にさらされる場合、陽性の流体圧力が送達される。流体圧力は、流体（水または空気等）内のいくつかのポイントでの圧力である。例えば、閉鎖条件下で流体が含まれる体積は一定である。本発明の様々な実施形態において、流体圧力の規格は固定体積のチャンバー内の気圧を指す。

【 0 0 9 5 】

流体圧力が、本発明の方法が実施される場所で閉鎖システムの外側の周囲気圧を超える場合、陽圧と称される。丸のままの植物または複数の丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または植物体における植物器官または植物組織を含む丸のままの手を加えていない植物の部分）および細菌が、周囲気圧よりも高い標的圧力に曝露されている場合、陽圧または過剰圧力が提供される。過剰圧力および陽圧という用語は本明細書において互換的に使用される。周囲気圧は方法が実施される場所の高度および方法が実施される時間の天候に依存して変動し、当該技術分野において公知の技法および機器によって容易に決定することができる。

【 0 0 9 6 】

多くの単位を使用して圧力の値を表現することができる。例えば、barは100キロパスカルと等しく、海面での地球上の大気圧とおよそ等しい圧力の単位である。大気圧は多くの場合ミリバールで与えられ、そこで標準的な海面圧力（1気圧）は1013.25 mbar (hPa) として定義され、1.01325 bar と等しい。

【 0 0 9 7 】

したがって本発明において有用な陽圧値は周囲気圧のパーセンテージ値に換算して表現することができ、例えばそして限定されずに、110%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、350%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%、1050%、1110%、1150%、1200%、または任意の中間値、または前述のものをを超える任意の値である。類似した慣例を周囲気圧よりも低い圧力値

10

20

30

40

50

である陰圧の記載のために使用することができる。

【0098】

陽圧はあるいは絶対値に換算して表現することができ、例えばそして限定されずに、1.1気圧、1.5気圧、2気圧、2.5気圧、3気圧、3.5気圧、4気圧、4.5気圧、5気圧、5.5気圧、6気圧、6.5気圧、7気圧、7.5気圧、8気圧、8.5気圧、9気圧、9.5気圧、10気圧、10.5気圧、11気圧、11.5気圧、12気圧、など；または1.1bar、1.5bar、2bar、2.5bar、3bar、3.5bar、4bar、4.5bar、5bar、5.5bar、6bar、6.5bar、7bar、7.5bar、8bar、8.5bar、9bar、9.5bar、10bar、10.5bar、11bar、11.5bar、12bar、または任意の中間値、または前述のものをを超える任意の値である。周囲気圧が記述中の比較のために本明細書において提供されない場合、周囲気圧は海面での地球上の標準大気圧であることが意図される。

10

【0099】

本明細書において使用される「圧力サイクル」という用語は、一定の期間にわたる圧力における1シリーズの変化を指す。一実施形態において、圧力サイクルは標的圧力（すなわち、与えられた期間内で到達されるべき圧力）を含む。例えば、チャンパー中の所望される圧力は、圧力サイクルの間に周囲気圧と平衡状態から開始し標的圧力へ変化し周囲気圧に戻る。したがって、本発明において使用されるチャンパーは、大気より上に圧力を増加させることによって圧力サイクルを開始し、大気と平衡化することによって圧力サイクルを終えることができる。

20

【0100】

本発明の様々な実施形態において、開始圧力および終末圧力が異なり、各々は周囲気圧と異なり得る。例えば、陽性気圧のパルスは単一の圧力サイクルである。圧力サイクルは、特定の実施形態において複数の標的圧力（例えば第1の標的圧力、第2の標的圧力、第3の標的圧力など）を含み得る。したがって、異なる圧力サイクルは、各々異なる開始圧力および終末圧力、ならびに任意の数の不連続の中間標的圧力または開始圧力から終末圧力への連続的な推移を有することができる。

【0101】

本発明の方法において、複数の異なる圧力サイクルを適用することができ、各々を1つまたは複数回（2、3、4、5、6、7、8、9または10回等であるがこれらに限定されない）を適用することができる。したがって、本発明の方法またはさらに圧力サイクルにおいて、圧力の変動は、経時的にグラフまたは波形（正弦波、矩形波、三角波もしくはのこぎり波または前述のものの中の1つに近似する任意の波形）によって表現することができる。

30

【0102】

本発明の様々な実施形態において、期間または程度の面から流体圧力の任意の規格は、丸のままの手を加えていない植物または複数の丸のままの植物または丸のままの手を加えていない植物の部分へ適用される、圧力サイクルの全体的な期間および圧力のピーク値を指す。例えば、0.5秒で少なくとも4.5のbarの圧力により丸のままの植物または植物部分を処理することを含む圧力サイクルへの参照は、植物へ適用された圧力の全体的な持続期間が0.5秒であり、大気より上に圧力を4.5barのピーク値で増加させて、大気と平衡化することによって圧力サイクルを終える期間を含み得ることを意味する。

40

【0103】

好ましくは、本発明の圧力サイクルは陽圧である標的圧力を含む。特定の実施形態において、本発明の方法は陰圧である標的圧力を含まない。他の実施形態において、本発明の方法は、陽圧である第1の標的圧力に加えて、陰圧である第2の標的圧力を含む。他の実施形態において、本発明の方法は、陽圧である第2の標的圧力と同様に陰圧である第1の標的圧力を含む。本発明の方法においてオプションの休止期間を圧力サイクルの間を含むことができる。

50

【0104】

かかる休止期間は、約0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5または5および最大10秒以上の間持続してもよい。

【0105】

特定の実施形態において、発現コンストラクトを含むアグロバクテリウム細胞を、丸のままの植物または複数の丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または植物体における植物器官または植物組織を含む丸のままの手を加えていない植物の部分）の中へインフィルトレーションする。一実施形態において、インフィルトレーションは、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤および両性イオン性界面活性剤を含む界面活性剤の存在下において実行される。

10

【0106】

使用できる界面活性剤の非限定的例は、トリトンX-100またはSilwet L-77（植物に対して比較的低い毒性を示す強い界面活性剤）である。

【0107】

複数の植物細胞において発現コンストラクトが対象となるペプチドまたはタンパク質を発現することを可能にする好適な条件下で植物または植物の組織をインキュベーションした後に、植物または植物部分（植物器官または植物組織等）またはその細胞においてタンパク質を検出し定量することができる。収穫後に、ペプチドまたはタンパク質の単離は当該技術分野においてルーチンの方法を使用して実行することができる。例えば、少なくともバイオマスの部分をホモジナイズし、組換えペプチドまたはタンパク質を抽出し、さらに精製することができる。抽出は好適な溶媒中にホモジネートを浸すかまたは浸漬することを含み得る。精製法は、ペプチド、タンパク質もしくはタンパク質複合体の特定のサイズ、電気泳動移動度、生物学的活性および/または単離されるべきペプチドまたはタンパク質の正味電荷に基づくか、またはタンパク質におけるタグ分子の存在に基づく免疫親和性精製および精製手順を含むが、これらに限定されない。単離されたペプチドまたはタンパク質の特徴づけは免疫アッセイまたは当該技術分野において公知の他の方法によって行うことができる。例えば、ペプチドまたはタンパク質は、ウエスタンブロットによって、またはペプチドまたはタンパク質が実質的に精製される場合はクマシーブルー染色することによって、SDS-PAGEゲル上で分析することができる。

20

30

【0108】

本発明の別の実施形態において、陽性の流体圧力の応用に際してアグロバクテリウム細胞と接触される、手を加えていない丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または植物器官または植物組織の植物部分）を処理するシステムが提供される。本発明のシステムは、丸のままの植物（特に丸のままの手を加えていない植物または植物器官もしくは植物組織等の植物の部分または複数のかかる丸のままの植物もしくは植物部分）を収容するためのチャンバーおよび陽性の流体圧力を送達するための手段を含む。チャンバーは、本発明の目的のための一定の形状を維持し、本発明において使用される流体に対する透過性がない当該技術分野において公知の任意の材料から作製することができる。チャンバーは、丸のままの植物または植物組織等の植物の部分を受容および回収でき、チャンバー中の圧力を調節する、少なくとも1つの開口部を含む複数の注入口および流出口を含む。特定の実施形態において、チャンバーは、チャンバーとシーリング係合してチャンバーを閉鎖することに適合した開口部およびカバー、チャンバーの側面またはカバーを通してバルブ開口部を形成する手段、ならびにシーリング係合においてチャンバーおよびカバーをロック位置に放出可能に維持するための固定手段；ならびにチャンバーの内部および外部との間の流体経路の提供のためのバルブ開口部に対して据え付けた少なくとも1つの柔軟なバルブ手段を含む。

40

【0109】

システムは、複数の丸のままの植物または植物部分をアグロバクテリウム細胞と接触させる手段を任意で提供することができる。好ましくは、アグロバクテリウム細胞と丸のま

50

まの植物または植物部分の接触は、陽圧が送達されるチャンバー中で実行される。陽性の流体圧力は当該技術分野における公知の任意の手段によって送達することができる。

【0110】

一実施形態において、本発明では、丸のままの手を加えていない植物をチャンバーの内部で上下逆さまで配置し、葉をアグロバクテリウム細胞を含む液体中に完全に浸漬する。チャンバーは注入口バルブ経由で減圧装置を通して圧縮空気源へ連結される。チャンバーは、1つの壁、好ましくはチャンバーの蓋に設置された放出バルブも含む。減圧装置および注入口バルブは、1つまたは複数の標的圧力がチャンバー中で達成できるようにチャンバー中の圧力を調節するために使用される。例えば、陽圧の送達を開始するために、チャンバーは閉鎖され、注入口バルブはオフへと切り替えられ、減圧装置は標的圧力に設定される。植物が液体中に浸漬された後、チャンバーが標的圧力を達成するのに十分な第1の期間、および標的圧力がチャンバー中で維持されるときに第2の期間で注入口バルブは開けられる。期間が経過した後、注入口バルブを閉鎖し、放出バルブを開けてチャンバーが周囲気圧へ戻ることを可能にする。

10

【0111】

別の実施形態において、本発明では、複数のノズルおよびチャンバーの側面上の放出バルブを含むチャンバーの内部に丸のままの手を加えていない植物が配置される。ノズルは一般のマニホールドへ連結され、そしてそれは第1の注入口バルブを介してアグロバクテリウム細胞を含む液体のリザーバーに連結される。圧縮空気源は減圧装置および第2の圧力バルブを通してノズルへ連結される。減圧装置を使用して、チャンバー中で達成されるべき標的圧力を設定する。例えば、陽圧の送達を開始するために、チャンバーを閉鎖し、注入口バルブ、圧力バルブおよび放出バルブをすべて閉鎖し、減圧装置を標的圧力へ設定する。次いで、細菌を含む液体が圧縮空気によって霧化またはアエロゾル化され、チャンバーの内部の植物上にノズルを通して噴霧されるように、注入口バルブおよび圧力バルブは協調的に開けられる。注入口バルブおよび圧力バルブ、または圧力バルブは、チャンバーが標的圧力を達成するのに十分な第1の期間、および標的圧力がチャンバー中で維持されるときに第2の期間で開けられる。期間が経過した後、注入口バルブおよびノズルまたは圧力バルブを閉鎖し、放出バルブを開けてチャンバーが周囲気圧に戻ることを可能にする。

20

【0112】

本発明の他の実施形態において、液体の流体圧力（または水圧）は、丸のままの手を加えていない植物または丸のままの手を加えていない植物の部分が浸水されるインフィルトレーション培地の封入された体積へ適用されることが意図される。液体流体圧力は、任意の従来手段（ギヤーポンプ、ペーンポンプおよびピストンポンプを含む水圧ポンプ等であるがこれらに限定されない）によって供給することができる。

30

【0113】

上記の機器に加えて、本発明のシステムは、様々な他の機器、例えばバルブ（例えば逃がしバルブ、チェックバルブ、手動バルブ、作動バルブ、ニードルバルブおよび同種のものに加えて前述のバルブのうちの少なくとも1つを含む組み合わせ）、フィルター（例えば細菌用フィルターおよび粒子用フィルターおよび同種のものに加えてその組み合わせ）、センサー（例えば圧力、温度、流量、湿度、伝導性、気体混合物、液体レベルおよび同種のものに加えて前述のセンサーのうちの少なくとも1つを含む組み合わせ）、温度の制御（ヒーター、熱交換器、冷却器、ドライヤーおよび同種のもの等）、圧力の制御（コンプレッサーおよび同種のもの等）、流れ制御（ポンプ、ファン、送風器および同種のもの等）に加えて、前述の制御のうちの少なくとも1つを含む組み合わせ、および導管（例えば流体導管と電線用導管および同種のもの）に加えて前述の導管のうちの少なくとも1つを含む組み合わせをさらに含み得る。

40

【0114】

上記の機器に加えて、本発明のシステムは、複数の丸のままの植物または植物部分（植物器官または植物組織等）をある場所からチャンバーへ輸送するための手段、アグロバクテリウム細胞と複数の丸のままの植物または植物組織の接触を促進するための手段、チャ

50

ンバー中の複数の丸のままの植物または植物組織を収容するための手段、チャンバー中の複数の丸のままの植物または植物部分（植物器官または植物組織等）を配置および再配置するための手段、チャンバーから複数の丸のままの植物または植物部分を回収するための手段を任意でさらに含むことができる。好ましくは、1つまたは複数の前述の手段は自動化された電氣的機械システムであり、モーターによる輸送システム、工場自動化システム、セキュリティシステム、プロセス制御システム、データ通信システム、データ保存システムおよびコンピューティングシステムを含むが、これらに限定されない。

【0115】

本発明の一実施形態において、チャンバーは、チャンバー内の複数の丸のままの手を加えていない植物を植物全体がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地と接触するように収容および配置するための手段を含む。特に、複数の植物は、その地上部および地中部を含む植物全体がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水されるように配置される。この構成において、植物の地上部に加えて地中部も含む植物全体をアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地と接触させる。浸水した植物は1つまたは複数の圧力サイクルにさらされ、圧力サイクルの少なくとも1つは大気圧と比較して増加した圧力を含み、特定の実施形態において、圧力は0.5秒～60秒の期間の間維持される。1つまたは複数の圧力サイクルの間に、チャンバーは好ましくはその内部の空気がないかまたは無視できる状態で閉鎖およびシールされ、その結果、封入されたインフィルトレーション培地上に圧力が適用される場合、チャンバーはチャンバーの壁からの抵抗性に起因して加圧されるようになり、実質的に一様な圧力が浸水した植物を含むチャンバーの全体にわたって伝達される。この構成において、浸水した植物に作用する圧力は、システムへ適用されたものと実質的に同じである。

【0116】

本発明の別の実施形態において、チャンバーは、チャンバー内の複数の丸のままの手を加えていない植物を植物の一部のみがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地と接触するように収容および配置するための手段を含む。特に、複数の植物は、植物の地上部のすべてまたは部分がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水されるが、植物の地中部（特に植物の根）がインフィルトレーション培地中に浸水されないように配置される。この構成において、植物の地上部に加えて地中部を含む植物全体は1つまたは複数の圧力サイクルにさらされ、圧力サイクルの少なくとも1つは大気圧と比較して増加した圧力を含み、特定の実施形態において、圧力は0.5秒～60秒の期間の間維持される。

【0117】

図5は本発明のかかる実施形態の一例を示す。システム10は蓋12を有するチャンバー11を含む。蓋12によりチャンバー11はシーリングで閉鎖することができる。図5中に示されるように、この実施例において、丸のままの手を加えていない植物13は、植物の地上部を液体中に完全に浸漬してチャンバーの内部に上下逆さまで提供される。システム10は導管15を通してチャンバー11と連結する液体タンク14も含む。液体タンク14はピストン17と連結したプランジャーロッド16を含む。ピストン17が下方へ移動される場合、液体タンク14からの液体は導管15を通してチャンバー11の中へ圧迫されるだろう。植物の葉が浸漬され大気圧と関連する圧力にさらされるように、チャンバー11中の液体レベルおよびさらに圧力が上昇される。

【0118】

本発明のさらに他の実施形態において、複数の植物は、植物の地上部のすべてまたは部分がアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水され、1つまたは複数の圧力サイクルにさらされ、圧力サイクルの少なくとも1つは大気圧と比較して増加した圧力を含み、特定の実施形態において、圧力は0.5秒～60秒の期間の間維持されるように、チャンバー中に配置される。この構成において、植物の地中部（特に植物根）は、それらがアグロバクテリウム細胞を含むインフィルトレーション培地中に浸水されず、1つまたは複数の圧力サイクルの間に適用される圧力にさらされないようにチャンバ

一の外部に配置される。1つまたは複数の圧力サイクルの間に、チャンバーは好ましくはその内部の空気がないかまたは無視できる状態で閉鎖およびシールされ、その結果、封入されたインフィルトレーション培地に圧力が適用される場合、チャンバーはチャンバーの壁からの抵抗性に起因して加圧されるようになり、実質的に一様な圧力が浸水した植物の地上部を含むチャンバーの全体にわたって伝達される。この構成において、浸水した植物に作用する圧力は、システムへ適用されたものと実質的に同じである。

【0119】

チャンバーの内部に丸のままの手を加えていない植物の地上部を収容するが地中部をチャンバーの外側に配置するために、チャンバーの1つの側面(典型的には上部)は、挿入または除去の間の植物の地上部の通過を可能にするために1つまたは複数の開口部を含み得る。開口部の寸法は、丸のままの手を加えていない植物の部分が開口部において存在するので可変的である。開口部は、開口部の可変的な寸法にもかかわらず開口部を閉鎖することができるように弾性シールにより裏打ちされる。シールの弾性は、植物部分を機械的障害から保護することを支援することができる。典型的には、シールの弾性に起因して主要茎の周囲でシールが形成されるように、丸のまま手を加えていない植物を配置する。弾性シールは互いに向けて対抗して摺動するように構成され、一時的な気密接合または防水接合を効果的に形成するように開口部を閉鎖することができる。圧力サイクルの間に、植物のインフィルトレーション培地および地上部が弾性シールによって封入されているが、チャンバーは一時的に加圧することができる。

【0120】

かかる実施形態の一例は図6中に示される。図6はチャンバー20の概略的横断面図である。チャンバー20はヒンジ23を用いて互いと連結される2つの壁部分21、22を有する。図6中の左側図面は開放状態におけるチャンバー20を示す。2つの壁部分21、22の自由端部で可膨張式シール24が提供される。図6の右図面は、チャンバーが緊密にシールされるように膨張した2つのシール24による閉鎖状態におけるチャンバー20を示す。

【0121】

図7はチャンバー26の斜視概略図を示す。左側図面において示されるチャンバー26は、互いから間を置いて配置されている2つの可膨張式シール24による開放状態におけるものである。シールは各々蓋部25の縁部で提供される。蓋部25は、例えば摺動する様式で互いに向けておよび互いから離れて移動可能である。一旦植物が部分的に挿入されれば(図7中で上部右図面を参照)、2つの蓋部25は植物の茎の周囲で閉鎖され、シール24はチャンバー26を緊密にシールするために膨張される。

【0122】

移動可能な蓋部および長手方向のシール24により示された配置が単に例示的な実施形態であり、他の立体配置が本発明によって包含されることは当業者によって理解される。例えば、チャンバー26は、円筒状または管状の形態を有する代わりに、植物の部分の収容のために円形開口部を備えた球状形態を有することができる。円形開口部の縁部に沿って、植物の茎の周囲でチャンバーの全体の開口部を閉鎖するような程度に膨張可能な単一の環状シールが提供され得る(気密シールまたは防水シールを提供する等)。

【0123】

特定の実施形態において、発明は弾性の空気圧シールまたは水圧シールを提供し、そこで各々のシールは、圧縮した空気もしくは不活性ガスまたは膨張圧力下の水圧流体が導入される空洞を含む。膨張圧力により、シールと丸のまま手を加えていない植物の部分との間に存在するギャップの中へそのままでは脱気したシールを柔軟に拡張させ、一時的な気密接合または防水接合を効果的に形成する。1つの特定の立体配置において、少なくとも2つの対抗するシールが1つまたは複数の丸のまま手を加えていない植物の主要茎が配置される開口部を裏打ちする。膨張に際して、対抗するシールは互いを押し出してそれらの間の植物の主要茎(複数可)をトラップするまでそれらの間の空間の中へ拡張して、一時的な気密接合または防水接合を形成する。一旦シール膨張圧力が除去されれば、シールは

10

20

30

40

50

脱気した位置に戻り、チャンバーの内部の圧力を効果的に逃がす。一実施形態において、弾性シールへの膨張圧力の適用およびチャンバー中のインフィルトレーション培地への水圧の適用は順番に行えることが意図される。好ましくは、弾性シールへの膨張圧力の適用は水圧の適用に先立ち、その結果チャンバーが加圧されるようになる前に接合が形成される。

【0124】

いくつかの適用において、水圧（液体）手段が適用されていてもよいが、一般的には圧縮空気は膨張媒体として利用される。可膨張式シールは3つの異なる面（半径方向の内側、半径方向の外側、および軸方向）において多目的な立体配置を提供する。歯止めの形態のシールは、閉鎖端部、司教帽状端部および連続的なループを形成することができる。空気圧シールまたは水圧シールは、シリコン、ブタジエンスチレン（SBR）、クロロプレン（ネオプレン）、エチレンプロピレン（EPDM）およびフッ素化炭化水素（Vitron（登録商標））を含むエラストマーの種類から作製することができる。

10

【0125】

当業者は、広範囲の電気部品（ハードウェア、ソフトウェア、ファームウェアまたは実質的にはその任意の組み合わせ等）；および機械的力または機械的運動を与え得る広い範囲のコンポーネント（剛体、バネもしくはねじれ物体および水力学ならびに電気磁氣的に作動する装置またはその任意の組み合わせ）を有する、様々なタイプの電気機械的システムによって、本明細書において記載された様々な実施形態を個別におよび/またはまとめて実施できることを認識するだろう。したがって、本明細書において使用される時「電気機械システム」は、トランスデューサーと作動可能にカップルした電気回路（例えばアクチュエーター、モーターと圧電性結晶など）、少なくとも1つの個別の電気回路を有する電気回路、少なくとも1つの集積回路を有する電気回路、少なくとも1つの特定用途向け集積回路を有する電気回路、コンピュータプログラムによって構成された汎用計算装置を形成する電気回路（例えばプロセスを少なくとも部分的に実行するコンピュータプログラムによって構成された汎用コンピュータおよび/または本明細書において記載される装置、またはプロセスを少なくとも部分的に実行するコンピュータプログラムによって構成されたマイクロプロセッサおよび/または本明細書において記載される装置）メモリー装置を形成する電気回路（例えばランダムアクセスメモリの形態）、コミュニケーション装置を形成する電気回路（例えばモデム、コミュニケーションスイッチまたは光学電気機器）、およびその任意の非電気式類似物（光学的または他の類似物等）を含むがこれらに限定されない。

20

30

【0126】

様々な実施形態において、対象となる遺伝子（複数可）（特に対象となる異種遺伝子（複数可））を備えた発現コンストラクトを保有するアグロバクテリウムの細胞を使用して、植物または植物部分の細胞および/または細胞外空間中の一過性の発現のために、丸のままの手を加えていない植物もしくは植物部分（植物器官または植物組織等）への遺伝子（複数可）を送達する。一般的に、好適な発現コンストラクトは少なくとも1つのT-DNA境界配列、発現調節配列（例えば誘導可能または構成的であり得るプロモーター、活性が組織特異的であるかまたは組織バイアスがかかるプロモーター）、および発現調節配列へ作動可能に連結された対象となる遺伝子を含む。特定の実施形態において、発現コンストラクトは、好適なプロモーターおよびさらなる発現調節配列の制御下で選択可能な標識遺伝子をさらに含む。特定の実施形態において、発現コンストラクトは、1つまたは複数の複製起点（アグロバクテリウム種において発現コンストラクトを含むベクターを複製するのに好適な少なくとも1つの複製起点）を含むベクターの一部である。

40

【0127】

本発明において使用することができるアグロバクテリウム種は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（*tumefaciens*）、アグロバクテリウム・リゾゲネス（*rhizogenes*）、アグロバクテリウム・ラジオバクター（*radiobacter*）、アグロバクテリウム・ルビ（*rubii*）、アグロバクテリウム・ピティス（*vitis*

50

)を含み、これらに限定されないが、特にアグロバクテリウム・ツメファシエンスおよびアグロバクテリウム・リゾゲネスである。一実施形態において、少なくとも1つのアグロバクテリウム株はアグロバクテリウム・ツメファシエンスを含む。使用するアグロバクテリウム種は野生型(例えば病原性)または安全化株であり得る。アグロバクテリウムの好適な株は、野生型株(例えばアグロバクテリウム・ツメファシエンス等)または1つまたは複数の遺伝子が突然変異して形質転換効率を増加させた株(例えば突然変異体またはキメラの*vir A*遺伝子もしくは*vir G*遺伝子の存在に起因して*vir*遺伝子発現および/またはその誘導が改変されたアグロバクテリウム株等(例えばChen and Winans, 1991, J. Bacteriol. 173: 1139-1144; および Scheeren-Groot et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 6418-6246)、多重コピーのプラスミドと好ましくは連結されたpTiBo542に由来するスーパー*vir G*遺伝子等の余剰の*vir G*遺伝子コピーを含むアグロバクテリウム株(例えば米国特許第6,483,013号における記載されるような))を含む。他の好適な株は、A. ツメファシエンスC58C1(Van Larebeke et al., Nature 252: 169-170(1974))、A136(Watson et al., J. Bacteriol. 123: 255-264(1975)); LBA4011(Klapwijk et al., J. Bacteriol. 141: 128-136(1980))、LBA4404(Hoekema et al., Nature 303: 179-180(1983)); EHA101(Hood et al., J. Bac. 168: 1291-1301(1986)); EHA105(Hood et al., Trans Res. 2: 208-218(1993)); AGL1(Lazo et al., Bio/Technology 2: 963-967(1991)); A281(Hood et al., supra(1986))を含むが、これらに限定されない。

【0128】

複数のアグロバクテリウム株(各々は異なる遺伝子を発現する)を使用して、個々のタンパク質またはヘテロ多量体タンパク質を産生するかまたは対象となるペプチドまたはタンパク質の収率を促進することができる。発現することができる異なる遺伝子の非限定的例はウイルス起源のサイレンシング抑制因子をコードする遺伝子である。あるいはまたは加えて、単一のアグロバクテリウム株は、異なる対象となる遺伝子(特に対象となる異種遺伝子)を含む複数の配列を含むことができる。異なる遺伝子は単一の核酸分子(例えば単一のベクター)内に含まれるかまたは異なるベクター中で提供されてもよい。

【0129】

本発明の方法は、以下のものを含むが、これらに限定されない植物の多くの種のアグロバクテリウムインフィルトレーションおよび一過性の発現に使用することができる。タバコ(ニコチアナ属の種)、レタス、アルファルファ、緑豆、ほうれん草、タンポポ、ラディッキョ、ルッコラ、エンダイブ、キクヂシャ、チコリー、アーティチョーク、トウモロコシ、じゃがいも、コメ、ダイズ、綿、小穀物類、小麦、大麦、ソルガム、サトウダイコン、キャノーラ、アブラナ科(例えばアブラナ、シロイヌナズナ)、ウキクサ、およびトマト。好適な植物器官または組織は一般的に植物の任意の部分になりえる。1つの好ましい態様において、植物組織は葉組織である。一態様において、植物組織は少なくとも1つの次元において少なくとも約7~8cmの葉を含む植物からの葉組織である。

【0130】

様々な実施形態において、細胞が異種タンパク質を消化するプロテアーゼを検出不能または低レベルで含む植物種、品種またはさらに植物器官(少なくともおよそタンパク質が植物組織から単離される時間までに、異種タンパク質を発現する核酸の導入からの期間の間に植物において発現された異種タンパク質の例えば約5%未満、約1%未満、約0.1%未満が消化される)が選択される。プロテアーゼレベルは、異種タンパク質発現のウエスタンブロット分析を含む当該技術分野においてルーチンの方法の使用でアッセイすることができる。

【0131】

ニコチアナ属の例示的な種は、ニコチアナ・アフリカナ (*africana*)、ニコチアナ・アムプレキシカウリス (*amplexicaulis*)、ニコチアナ・アレントシ (*arentsii*)、ニコチアナ・ベンサミアナ (*benthamiana*)、ニコチアナ・ビゲロビ (*bigelovii*)、ニコチアナ・コリンボサ (*corymbosa*)、ニコチアナ・デブネイ (*debneyi*)、ニコチアナ・エクセルシオル (*excelsior*)、ニコチアナ・エキシグア (*exigua*)、ニコチアナ・グルチノサ (*glutinosa*)、ニコチアナ・グッドスピーディ (*goodspeedii*)、ニコチアナ・ゴセイ (*gossei*)、ニコチアナ・ヘスペリス (*hesperis*)、ニコチアナ・イングルバ (*ingulba*)、ニコチアナ・ナイトアナ (*knightiana*)、ニコチアナ・マリチマ (*maritima*)、ニコチアナ・メガロシホン (*megalosiphon*)、ニコチアナ・ミエルシ (*miersii*)、ニコチアナ・ネソフィラ (*nesophila*)、ニコチアナ・ノクチフロラ (*noctiflora*)、ニコチアナ・ヌジカウリス (*nudicaulis*)、ニコチアナ・オトホラ (*otophora*)、ニコチアナ・パルメリ (*palmeri*)、ニコチアナ・パニクラタ (*paniculata*)、ニコチアナ・ペツニオイデス (*petunioides*)、ニコチアナ・ブルムバギニフォリア (*plumbaginifolia*)、ニコチアナ・レパンダ (*repanda*)、ニコチアナ・ロスラタ (*rosulata*)、ニコチアナ・ロツンジホリア (*rotundifolia*)、ニコチアナ・ルスチカ (*rustica*)、ニコチアナ・セトケリ (*setchelli*)、ニコチアナ・ストックトニ (*stocktonii*)、ニコチアナ・エアスチイ (*eastii*)、ニコチアナ・スアベオレンス (*suaveolens*) またはニコチアナ・トリゴノフィラ (*trigonophylla*) を含むが、これらに限定されない。望ましくは、第1のタバコ植物は、ニコチアナ・アムプレキシカウリス、ニコチアナ・ベンサミアナ、ニコチアナ・ビゲロビ、ニコチアナ・デブネイ、ニコチアナ・エクセルシオル、ニコチアナ・グルチノサ、ニコチアナ・グッドスピーディ、ニコチアナ・ゴセイ、ニコチアナ・ヘスペリス、ニコチアナ・ナイトアナ、ニコチアナ・マリチマ、ニコチアナ・メガロシホン、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・スアベオレンスまたはニコチアナ・トリゴノフィラである。

【0132】

ニコチアナ・タバカム属の例示的な品種は、商業品種 (DAC Mata Fina、P O2、BY-64、AS44、RG17、RG8、HB04P、Basma Xanthi BX 2A、Coker319、Hicks、McNair、944 (MN944)、Burley21、K149、Yaka JB 125/3、Kasturi Mawar、NC297、Coker371 Gold、Wislica、Simmaba、Turkish Samsun、AA37-1、B13P、BU21xHoja Paradoの交配からのF4、97系統、Samsun、PO1BU64、CC101、CC200、CC27、CC301、CC400、CC500、CC600、CC700、CC800、CC900、Coker176、Coker319、Coker371 Gold、Coker48、CU263、DF911、Galpa oタバコ、GL26H、GL350、GL737、GL939、GL973、HB04P、K149、K326、K346、K358、K394、K399、K730、KT200、KY10、KY14、KY160、KY17、KY171、KY907、KY160、Little Crittenden、McNair373、McNair944、msKY 14xL8、Narrow Leaf Madole、NC100、NC102、NC2000、NC291、NC297、NC299、NC3、NC4、NC5、NC6、NC606、NC71、NC72、NC810、NC BH129、OXFORD207、「Perique」タバコ、PVH03、PVH09、PVH19、PVH50、PVH51、R610、R630、R7-11、R7-12、RG17、RG81、RGH4、RGH51、RGH4

、RGH51、RS1410、SP168、SP172、SP179、SP210、SP220、SPG-28、SPG-70、SPH20、SPNF3、TN86、TN90、TN97、TND94、TND950、TR(Tom Rossion)Madole、VA309、VA309またはVA359等)を含む。

【0133】

任意のステージのタバコ植物を使用することができ、特にタバコ植物は、ステージ6、7、8、9、10、11、12、13、14または15である。本発明の特定の実施形態において、ステージ8、9または10での植物は使用され、そこで植物は約6.5cm～約16.5cmの間の平均長を有する。ステージ10で植物は5～6週齢であり、高さは約15cmであり、よく伸長した葉および最大1つの開いた花を持つ。

10

【0134】

2009年2月のCORESTAガイドN°7、「A Scale For Coding Growth Stages In Tobacco Crops」、Task Force Growth Stages and Identification Keys for Tobacco、pp.1-15、Centre de Co-operation pour les Recherches Scientifiques au Tabac.(http://www.coresta.org/Guides/Guide-No7-Growth-Stages_Feb09.pdf)中で1～9のスケールにわたるタバコにおける重要な成長段階を同定する代替システムが開示される。CORESTAシステムによれば、成長段階2～8における植物、しかし特に成長段階3～5における植物を使用することができる。

20

【0135】

大きな葉表面面積を備えたタバコ植物が好ましい。本発明の方法において既に成長した植物を使用できるか、または植物組織の源として使用できることが、本発明の特有の利点である。

【0136】

本発明は、成長した商業的に入手可能な植物、特にタバコにおけるタンパク質産生を利用することを可能にするシステムおよび方法を提供し、短期間で治療用使用または予防的使用のために必要な量の組換え異種ペプチドまたはタンパク質を調達するという問題に対する新規の解決策を提供する。

30

【0137】

本発明の一態様において、方法は丸のままの植物または植物部分(植物組織等)の中へ対象となる異種ペプチドもしくはタンパク質または生物学的に活性のあるその断片をコードする配列を含む発現コンストラクトを導入すること、および植物または植物部分においてタンパク質を一過性に発現することを含む。コード配列は、植物または植物部分の細胞および/または細胞外空間においてコード配列の転写を駆動することができる発現制御配列へ作動可能に連結される。好ましくは、発現コンストラクトは、大きな腫瘍を誘導するT-DNA(「Ti」)プラスミドからの少なくとも1つのT境界配列を含む。さらに、好ましくは、発現コンストラクトは、少なくともアグロバクテリウム種(アグロバクテリウム・ツメファシエンス)の細胞において複製できるベクター内に含まれる。一態様において、丸のままの植物または植物部分は既に成長した植物からの葉組織を含む。

40

【0138】

好ましくは、植物(例えばニコチアナ・タバカム)は比較的大きな葉(例えば少なくとも1つの次元において約7～8cm以上)を含む。

【0139】

発現コンストラクトは発現ベクターの一部であり得、細菌の複製起点(アグロバクテリウムおよび/または大腸菌の複製起点等)の追加の所望される配列、細菌(アグロバクテリウム等)および/または植物細胞において機能するレポーター遺伝子(例えばGUS、GFP、EGFP、BFP、ガラクトシダーゼおよびその修飾形態)ならびに選択可能なマーカー遺伝子(例えば抗生物質耐性遺伝子および同種のもの)を含むことができる。こ

50

の目的のために、本発明の方法において使用される外来のDNAはマーカー遺伝子も含むことができ、その発現は初期のクローニングステージの間に非形質転換細胞からの形質転換細胞の分離を可能にする。かかるマーカー遺伝子は一般的に形質転換細胞と非形質転換細胞を表現型により区別することを可能にするタンパク質をコードする。しかしながら、発現コンストラクト/ベクターが導入される植物組織からの異種ペプチドまたはタンパク質の単離にマーカー遺伝子が必要とされないことは、本発明に記載の一過性のタンパク質産生方法の利点である。

【0140】

発現コンストラクトは、PVXのp25タンパク質、タバコエッチウイルスのP1-HcProタンパク質およびトマトブッシュスタントウイルスのp19タンパク質を含み、これらに限定されない、サイレンシング抑制因子（特にウイルスサイレンシング抑制因子）によりさらに相補することができる。

10

【0141】

本明細書において使用される時、一過性の発現のレベルは、1kgの植物組織質量あたり少なくとも約250マイクログラム、少なくとも約500マイクログラム、少なくとも約750マイクログラム、少なくとも約1mg、少なくとも約2mg、少なくとも約3mg、少なくとも約4mg、少なくとも約5mg、少なくとも約10mg、少なくとも約15mg、少なくとも約25mg、少なくとも約50mg、少なくとも約75mg、少なくとも約100mg、少なくとも約150mg、少なくとも約200mg、少なくとも約500mg、少なくとも約1000mg、少なくとも約1.5g、少なくとも約2g、少なくとも約2.5g、少なくとも約5g、少なくとも約7.5g、少なくとも約10g、少なくとも約15g、または少なくとも約20gを発現する能力を指す。本明細書において使用される時「一過性」は、好適な植物組織からタンパク質の単離を可能にするのに十分に長い一定の期間を指す。好ましくは、タンパク質発現は、植物組織の中への発現コンストラクトの導入後に、少なくとも約1日、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約4日、少なくとも約5日、少なくとも約6日、少なくとも約7日、少なくとも約8日、少なくとも約9日、少なくとも約10日、少なくとも約11日、少なくとも約12日、少なくとも約13日、少なくとも約14日、または少なくとも約15日以内に好適な高いレベルである。一態様において、好適な高いレベルは、植物組織の中への発現コンストラクトの導入後に、3～7日または5～10日内およびより好ましくは3～5日または5～7日内に得られる。

20

30

【0142】

本発明の方法によって産生された組換えタンパク質は、これらの産物がヒトへの直接的な摂取、注入または適用（例えば局所投与）のために使用されるので、医薬品として使用することができる。同様に規制された動物用産物の産生において有用である組換えタンパク質も発現され得る。産生され得る例示的なタンパク質は、増殖因子、受容体、リガンド、シグナル伝達分子；キナーゼ、酵素、ホルモン、腫瘍抑制因子、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、特定の疾患状態で欠損したタンパク質、抗体、抗原、疾患への抵抗性を提供するタンパク質、抗微生物タンパク質、インターフェロンおよびサイトカインを含むが、これらに限定されない。

40

【0143】

一態様において、配列をコードする抗原は防御免疫反応の誘導のために配列を含む（例えばワクチン配合におけるように）。かかる好適な抗原は、微生物抗原（ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、寄生虫抗原および同種のものを含む）；多細胞生物からの抗原（多細胞の寄生動物等）；アレルゲン；およびヒトまたは動物の病理学と関連する抗原（例えば癌、自己免疫疾患および同種のもの等）を含むが、これらに限定されない。1つの好ましい態様において、ウイルス抗原は、HIV抗原；インフルエンザへの防御免疫反応を付与するための抗原；ロタウイルス抗原；炭疽菌抗原；狂犬病抗原；および同種のものを含むが、これらに限定されない。ワクチン抗原は、例えば発現コンストラクト中で繰り返さ

50

れ、任意で1つまたは複数のリンカー配列によって分離される、異なるかまたは同じ抗原コード配列を含む、多価ペプチドまたはポリペプチドとしてコードされ得る。

【0144】

本発明の方法を使用して、化学物質合成または工業プロセスのための酵素経路を再現するために1つまたは複数の遺伝子を発現することができる。

【0145】

本発明は、以下の非限定的な図、表および実施例への参照によってさらに記載される。

【図面の簡単な説明】

【0146】

【図1】圧力チャンバーを含む過剰圧力システムのセットアップの概略図を示した図である。V1、V2、V3：バルブ；M1：水銀圧力計；S1：サイレンサー。

10

【図2】蛍光応答値(PMF015)についての実際の範囲にわたる2D等高線図を示した図である。

【図3】蛍光応答値(PMF132)についての実際の範囲にわたる2D等高線図を示した図である。

【図4】蛍光応答値(PMF204)についての実際の範囲にわたる2D等高線図を示した図である。

【図5】圧力下で丸のままの手を加えていない植物の中へアグロバクテリウム細菌をインフィルトレーションするためのシステムの概略図を示した図である。

【図6】チャンバー20の概略的横断面図を示した図である。

20

【図7】チャンバー26の斜視概略図を示した図である。

【0147】

〔表1〕アグロバクテリウム接種物の調製内に使用される、組成物A91(蛍光タンパク質TurboGFPの遺伝子を保有するAGL1株)およびA17(p19サイレンシング抑制因子の遺伝子を保有するAGL1株)に関する実験的な情報を示した表である。

〔表2〕アグロバクテリウム接種物の調製内に使用される、組成物A91(蛍光タンパク質TurboGFPの遺伝子を保有するAGL1株)およびA17(p19サイレンシング抑制因子の遺伝子を保有するAGL1株)に関する実験的な情報を示した表である。

〔表3〕インフィルトレーション実験内で使用されるパラメータによる6つの異なる条件を示した表である。

30

〔表4〕さらなるインフィルトレーション実験内で使用されるパラメータによる9つの異なる条件を示した表である。

〔表5〕植物抽出物(TurboGFPを発現しないA17のみによりインフィルトレーションしたN.b.葉サンプルからのモック抽出物)におけるTurboGFP対照タンパク質(rTurboGFP、Evrogen#FP552)の標準的な希釈を示した表である。

〔表6〕g凍結重量あたりの μg GFPで表現されたGFP濃度に基づいた条件間の差異の95%の信頼区間による分析を示した表である。

〔表7〕%TSP(「可溶性タンパク質の合計」)で表現されたGFP濃度に基づいた条件間の差異の95%の信頼区間による分析を示した表である。

40

〔表8〕インフィルトレーションした葉の μg GFP/g凍結重量に基づいた条件間の差異の95%の信頼区間による分析を示した表である。

〔表9〕1植物あたりのmg GFPに基づいた条件間の差異の95%の信頼区間による分析を示す。

〔表10〕TSPのパーセントにおけるGFP濃度(「可溶性タンパク質の合計」)濃度に基づいた条件間の差異の95%の信頼区間による分析を示した表である。

〔表11〕最適条件および参照における過剰圧力を比較するANOVAを示した表である。

〔表12〕最適条件および参照についての個々の95%の信頼区間による平均値を示した表である。

50

【0148】

前述の記述は以下の実施例を参照することにより、より完全に理解されるだろう。しかしながら、かかる実施例は本発明を実施する例示的な方法であり、本発明の範囲を限定することは意図しない。

【実施例】

【0149】

パートA：N．ベンサミアナのトランスフェクションのための陽圧によるアグロ-インフィルトレーションの効率の真空と比較した評価

【0150】

実施例1：全体的なセットアップ：

植物を、A91（蛍光タンパク質TurboGFPの遺伝子を保有するAGL1アグロバクテリウム株）、およびA17（p19サイレンシング抑制因子の遺伝子を保有するAGL1アグロバクテリウム株）の混合物からなる細菌懸濁液によりインフィルトレーションした。

【0151】

TurboGFPは、コペポーダのポテリーナ・プルマータ（*Pontellina plumata*）（節足動物門；甲殻綱；アゴアシ亜綱；橈脚類）からクローン化された緑色蛍光タンパク質CopGFPの改善されたバリエーションである[Shagin DA, et al., GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol Biol Evol*. 2004; 21(5): 841-50.]. TurboGFPは他の緑色蛍光タンパク質の蛍光よりも先に目視可能な明るい緑色蛍光（励起/放射、最大=482/502nm）を保持する。TurboGFPはEvrogen（Evrogen Joint Stock Company；Miklukho-Maklaya str, 16/10, 117997, Moscow, ロシア）から入手可能である。

【0152】

インフィルトレーションした植物におけるTurboGFPの発現は、

1) インフィルトレーションの2日後から収穫の日の間に青色光下で、丸のままの植物または分離したインフィルトレーションした葉のイメージングによって定期的にモニタリングし、

2) 抽出後にマイクロプレート蛍光リーダーで定量化した。

【0153】

1. 1バキュームインフィルトレーション：バキュームインフィルトレーションは、真空逃がしバルブ（5mmの直径）およびV-710 Buchiポンプ（3.8m³/時間）+V-855レギュレーターの追加によって修飾された30×30×30cmの内部寸法を備えたLabconco真空チャンバーにより実行された。適用される真空パラメータは以下のとおりであった。

- 大気圧から50mbar絶対圧への3分間の圧力低下、
- 50mbarでの1分間の保持時間、
- 約3秒の急速な逃がし。

この実験のために、細菌懸濁液により充填された1Lまたは2Lのビーカー中での地上部の浸漬によって、植物をひとつずつインフィルトレーションした。

【0154】

1. 2 過剰圧力：過剰圧力セットアップを図1中で示す。植物を上部蓋と連結されたその場限りのホルダーを通して1つの圧力チャンバー（体積約10リットル）の内部に上下逆さまで置いた。液体表面とホルダーとの間のクリアランスを最小限にするように、ホルダー位置を調整した。一旦蓋が閉鎖されたならば、以下の連続順序を実行して、陽圧により植物およびアグロバクテリウムを処理した。

1. 手動式ボールバルブV2およびV3の調整バルブを閉鎖して、V1を所望される圧縮

10

20

30

40

50

空気圧力に設定した。

2. V2を10秒間開け、タンクの内部で達成された圧力を水銀圧力計M1によってモニタリングした。

3. V2を閉鎖し、V3を開けてサイレンサーS1を通してシステムを通気することによってタンクを大気圧に戻した。

4. 蓋を開け、植物をホルダーから除去した。

【0155】

実施例2：アグロバクテリウム接種物の調製

A91（蛍光タンパク質TurboGFPの遺伝子を保有するAGL1株）およびA17（p19サイレンシング抑制因子の遺伝子を保有するAGL1株）の混合物からなる6×濃縮接種物を調製し（表1および2）、インフィルトレーションの日まで4で保存した。

表1

【表1】

組成物	A91-A17
体積	3.3 L
OD600nm	1.926
濃度	6X
インフィルトレーション溶液のxLで希釈	16.7 L
インフィルトレーション溶液組成	5mM MES, 10 mM MgCl ₂ , pH5.6
グリセロール1	A91.393 09.09.09 JBE
グリセロール2	A17.1 16.06.09 SRO
培養1の最終的なOD600	3.3
培養2の最終的なOD600	3.1

表2

【表2】

組成物	A91-A17
体積	2x 1 L
OD600nm	2.0
濃度	6X
インフィルトレーション溶液のxLで希釈	2x 5 L
インフィルトレーション溶液組成	5mM MES, 10 mM MgCl ₂ , pH5.6
グリセロール1	A91.393 09.09.09 JBE
グリセロール2	A17.1 24.09.09 SRO
培養1の最終的なOD600	A91: 2.27
培養2の最終的なOD600	A17: 2.25

【0156】

濃縮接種物を、インフィルトレーションの開始～1時間前に室温（～20℃）で、インフィルトレーション溶液（5mM MES、10mM MgCl₂、pH5.6）中で1×の最終的な濃度に希釈した。1×の最終的な濃度は、A91およびA17の1：1比で0.3の最終的なOD600nmに対応する。

【0157】

第2の実験については、1%（v/v）トリトンX-100のストック溶液をインフィルトレーション溶液中で調製し、指定されたときに、1：100希釈でインフィルトレーションタンク中の接種物に加えて0.01%（v/v）トリトンX-100の最終的な濃度を達成する。

【0158】

実施例 3 : バイオマス産生

ニコチアナ・ベンサミアナ、アクセッション M I M の植物を、20 時間の光、26 / 20 の昼 / 夜の温度および 70 % / 50 % の昼 / 夜の相対湿度により温室中で成長させた。自然光が 200 W / m² 未満である場合 (20 時間の光)、約 100 μmol / m² / s の PAR を与える 15000 または 20000 のルクス照明装置により 2 時 00 分 ~ 22 時 00 の間に、人工照明を自動的に作動させる。植物をロックウールブロック (Grodan Delta Grow Blocks サイズ 6.5) において成長させた。地下灌水による灌水同時施肥を、30 分間 25 mm の水で 2 日ごとに適用した。施肥は、2.5 mS / cm の EC および 5.8 の pH に調節された。

【0159】

実施例 4 : インフィルトレーションパラメータ

インフィルトレーション実験において、6 つの異なる条件を比較した。使用するパラメータは表 3 中で報告される。

表 3

【表 3】

順序	条件	標的圧力 [bar]	維持時間 [s]	重複測定の数	植物番号
1	真空	0.05絶対圧	60	6	1-6
2	過剰圧力	1	10	6	7-12
3	過剰圧力	2.5	10	6	13-18
4	過剰圧力	0.5	10	6	19-24
5	過剰圧力	1.5	10	6	25-30
6	過剰圧力	2	10	6	31-36

【0160】

第 2 のインフィルトレーション実験において、9 つの異なる条件を比較した。使用するパラメータは表 4 中で報告される。

表 4

【表 4】

順序	条件	標的圧力 [bar]	維持時間 [s]	重複測定の数	植物番号
1	注射器	未知	-	6	1-6
2	真空	0.05絶対圧	60	6	7-12
3	過剰圧力	2.5	10	6	13-18
4	過剰圧力	1.5	10	6	19-24
5	過剰圧力	2.0	10	6	25-30
6	過剰圧力	3.5	10	6	31-36
7	過剰圧力	3.0	10	6	37-42
8	過剰圧力+0.01%トリトン	2.5	10	6	43-48
9	真空+0.01%トリトン	0.05絶対圧	60	6	49-54

【0161】

インフィルトレーション連続順序を開始する直前に植物を重量測定した。インフィルトレーションの終了時に、植物をチャンバーから取り出し、「ドリッピングラック」中で上下逆さまに保持した。重量の測定値を通気工程の完了の 2 分および 10 分後にそれぞれとった。これらの 2 つの測定の間、最後の計量の終了時に回収領域において植物を配置ながら植物をラック中に上下逆さまで再び置いた。インフィルトレーション前後の重さの差異は、植物においてインフィルトレーションした接種物の体積の指標として使用することができる。

【0162】

実施例 5 : 回収およびインキュベーションの条件

インフィルトレーション後に、植物を収穫まで S 2 コンパートメント中の温室ベンチに置いた。必要な場合にドリップ灌水システムを使用して水および肥料を植物に与えた。環境条件（回収およびインキュベーション相の間に使用される施肥、光サイクルおよび温度等）は、植物の成長のために使用されるものと同じであった（上記参照）。t u r b o G F P 発現に影響を与えないことが以前に示されているので、植物の暗所インキュベーションはなかった。

【 0 1 6 3 】

実施例 6 : 蛍光イメージングのためのセットアップ

t u r b o G F P の一過性の発現は、インフィルトレーションの 5 日または 6 日後に青色光下での植物の撮影によってモニタリングした。t u r b o G F P (4 8 2 n m で最大励起) の励起の範囲内の光を放射するダークリーダーランプ (H L 3 2 T H a n d L a m p 、 C l a r e C h e m i c a l R e s e a r c h 、 U S A) を使用した。ランプ製造者によって提供されたアンバーフィルターを装備したデジタルカメラにより暗所環境において写真を撮影した。

【 0 1 6 4 】

実施例 7 : 収穫

次いで植物を青色光下に置き、すべては伸長し、蛍光を示すインフィルトレーションした葉を回収した。先端でのみ蛍光を示す主枝および腋枝の頂点の葉は収穫しなかった。収穫した葉を蛍光イメージングのためのプラスチックシートの下に最初に置いた。次いでそれらをジップバッグ中に置き、収穫が完了するまで 4 に移した。次いでバッグをすべて研究室に戻し、葉を分析のために加工するまで、マイナス 8 0 に移した。

【 0 1 6 5 】

実施例 8 : 蛍光の定量化

1 つのサンプルが、完全にホモジナイズした単一の植物から収穫されたすべてのインフィルトレーションした葉に対応するように、各々のバッグの内容物をコーヒングライNDER / ドライアイス方法を使用して細粉に破碎した。1 . 0 0 g ± 0 . 0 5 g 凍結重量の粉末のサブサンプルを抽出のためにドライアイス上で調製した。抽出は、3 m L の抽出緩衝液 (5 0 m M トリスベース ; 1 0 0 m M N a C l ; E D T A 1 m M ; 0 . 2 % トリトン X - 1 0 0 ; p H 7 . 5) に対して 1 g の凍結重量の比で、2 工程の 2 0 秒間のボルテックス続いて 2 0 0 0 0 g で 1 5 分間の遠心分離によって実行された。可溶性抽出物を分析のために冷凍した。

【 0 1 6 6 】

抽出物中の T u r b o G F P 濃度 (励起最大 : 4 8 2 n m / 放射最大 : 5 0 2 n m) を、ブルーオプティカルキット (励起 : 4 9 0 n m / 放射 : 5 1 0 ~ 5 7 0 n m) により蛍光モードにおいてモジュラスマイクロプレートリーダー (T u r n e r B i o s y s t e m s) で蛍光測定によって決定した。抽出物を抽出緩衝液中で 1 : 1 0 0 に希釈し、2 0 0 μ L を黒色 9 6 ウェルプレートに三重でロードした。抽出緩衝液中で最終的に 1 : 1 0 0 に希釈したモック抽出物 (A 1 7 のみをインフィルトレーションし、サンプルのために記載されるものと同じ条件で調製された N . b . 葉サンプルからの抽出物) に異なる量の T u r b o G F P 対照タンパク質 (r T u r b o G F P 、 E v r o g e n # F P 5 5 2) を加えることによって、スタンダードカーブを作製した。1 : 1 0 0 に希釈したサンプルからの蛍光は、第 1 の実験において 0 . 4 ~ 1 . 3 × 1 0 0 0 0 単位および第 2 の実験において 1 . 4 ~ 2 . 5 × 1 0 0 0 0 単位にわたり、三重の間での変動係数 (C V) は < 2 % であった。

表 5

10

20

30

40

【表5】

	$\mu\text{g/mL}$ におけるTurboGFPの濃度	$10\mu\text{g/mL}$ でのrTurboGFPの体積	1:50で希釈されたモック抽出物の体積	抽出緩衝液の体積
スタンダード1	4.0	320 μL	400 μL	80 μL
スタンダード2	3.0	240 μL	400 μL	160 μL
スタンダード3	2.5	200 μL	400 μL	200 μL
スタンダード4	2.0	160 μL	400 μL	240 μL
スタンダード5	1.5	120 μL	400 μL	280 μL
スタンダード6	1.0	80 μL	400 μL	320 μL
スタンダード7	0.5	40 μL	400 μL	360 μL
スタンダード8	0.25	20 μL	400 μL	380 μL
スタンダード9	0.125	10 μL	400 μL	390 μL
ブランク	0	0 μL	400 μL	400 μL

10

【0167】

TurboGFP濃度の関数としての蛍光単位のスタンダードカーブ。表中に示されるように調製された植物抽出物(TurboGFPを発現しないA17のみをインフィルトレーションしたN.b.葉サンプルからのモック抽出物)中のTurboGFP対照タンパク質(rTurboGFP、Evrogen #FP552)のスタンダード希釈の200 μL から、ブルーオプティカルキットにより蛍光モードにおいてモジュラスマイクロプレートリーダー(Turner Biosystems)で蛍光を読み取ることによって、この曲線を得た。各々の希釈を三重で読み取り、標準誤差(SE)を計算した($< 0.01 \times 10000$ 蛍光単位、示されない)。このスタンダードカーブを使用して、TurboGFPを発現するインフィルトレーションした植物材料から調製された可溶性抽出物中のTurboGFP濃度を定量した。

20

【0168】

実施例9：全可溶性タンパク質の定量化

抽出物中の全可溶性タンパク質を、マイクロプレートリーダーで595 nmの吸光度測定によってPierce(#24236)からのクマシー-プラスアッセイ試薬を使用して決定した。抽出物を超純水中で1:10または1:20に希釈し、10 μL を平底マイクロプレートに三重でロードした。100~400 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲でウシ血清アルブミン(BSA)の連続的な希釈からスタンダードカーブを作製した。結果は三重間の変動係数(CV)が8%未満の場合に有効であると判断された。

30

【0169】

結果

第1のインフィルトレーション実験を実行して、真空(50 mbar絶対圧)によるインフィルトレーションの効率を0.5 barから2.5 barにわたる陽圧値と比較した(表3)。

【0170】

インフィルトレーションの効率は、インフィルトレーション後の葉面積にわたる接種物の分布を調査することによって最初に査定された。葉の軸外の側面を観察する場合、インフィルトレーションされた面積は暗緑色として見える。真空によってインフィルトレーションした植物において、すべての葉の面積のほぼ100%は一樣にインフィルトレーションされた。0.5~1.5 barにわたる陽圧を使用してインフィルトレーションした植物は、接種物の非常にまだら状の分布を葉面積にわたり示した。下部の葉のインフィルトレーションはより低かった。インフィルトレーションは真空によってインフィルトレーションした植物におけるほど完全ではなかったが、2.0~2.5 barにわたる陽圧値を使用してインフィルトレーションした植物は、接種物のより一樣な分布を示した。

40

【0171】

50

第2の実験は、葉の内部の接種物の浸透を改善するために1.5 bar ~ 3.5 bar にわたる陽圧(表4)を使用して実行された。接種物への0.01%トリトンX-100の追加も2.5 barの過剰圧力条件と組み合わせて試験された。デタージェントの追加は、複数の植物システムにおけるインフィルトレーションおよびアグロバクテリウム媒介性一過性の発現の効率を促進することが報告されている。以下の3つの対照条件を使用した。植物を0.01%トリトンX-100の存在または非存在下で50 mbarの真空および注射器によってインフィルトレーションした。

【0172】

この第2の実験において、使用される植物は、より伸長した葉を持つ進んだ发育ステージ(ステージ10、平均16.5 cmの高さ、第1の実験においてステージ8に対応するわずが6.5 cmと比較されたい)に到達していた。使用した最低の陽圧(1.5 bar)でさえ、一般的に第1の実験の間よりも植物のインフィルトレーションはよりよかった。これには以下の2つの主な理由があるだろう。1) 実践的な理由のために、植物のサイズから、葉のすべてが過剰圧力タンクにおいて接種物中に完全に浸漬されたことがより容易に保証された。および2) 伸長した葉には、接種物の広がりを促進する細胞間隙における多くの空間を備えた葉組織の構造があるので、より効率的にインフィルトレーションすることができる。第1の実験において、過剰圧力が高いほどより一様で完全なインフィルトレーションが起こるという最初に指摘されたような傾向が検出された。3.0または3.5 barによりインフィルトレーションした植物は、真空によってインフィルトレーションした植物のものに同等と思われる接種物の非常に一様な分布を示した。このステージでは0.01%トリトン-X100の使用の明確な効果を検出することができなかった。

【0173】

インフィルトレーション後の回収およびインキュベーション相の間の植物の表現型をモニタリングした。収穫の時に、葉緑素含有量(定量化されなかった)のわずかな低下は、インフィルトレーションのために使用された条件と無関係に、インフィルトレーションした葉で目視可能であった(すなわちより薄い緑色)。他のストレスに関連する兆候(萎れ、重度な萎黄病または壊死等)はインフィルトレーション条件のいずれかにおいても観察されなかった。

【0174】

A91およびA17により共インフィルトレーションした植物におけるTurboGFPの発現を、青色光下でブラックボックス中に植物を置くことによって、インキュベーション相(インフィルトレーション2日後~収穫の日)の間に定期的にモニタリングし、アンバーフィルターによりTurboGFPからの蛍光を観察またはイメージした。GFPが発現される場合葉面積は緑色蛍光を放射する。GFPが発現されないかまたは濃度が低い場合、葉面積は植物組織からの天然の自己蛍光に起因して赤色に見える。

【0175】

すべてのインフィルトレーション条件について、低いGFP発現がインフィルトレーション2日後では既に目視可能であり、インフィルトレーションされた葉において時間とともに増加し、一方同時に植物は継続して发育し、インフィルトレーションされなかった頂点の新しく伸長した葉はGFP蛍光を示さず赤色に見えた。第1の実験および第2の実験において(植物のサイズに起因して丸のままの植物のイメージングが技術的に実現可能でなかったので図示せず)、GFP発現における明確な差異は、異なる条件においてインフィルトレーションした植物間で目視可能であった。

【0176】

これらの差異は収穫の日に撮影された分離した葉の画像からより容易に観察され得る。第1の実験において、非常にまだら状のパターンのGFP蛍光が、最低の過剰圧力(0.5 ~ 1.5 bar)を使用してインフィルトレーションした植物の葉から観察され、下部の葉からの蛍光は非常に弱かった。2.5 barの最高値を含む陽圧条件のいずれかにおいてインフィルトレーションした植物の葉からよりも、より明るいGFP蛍光が真空によってインフィルトレーションした植物の葉から観察された。小さな植物を使用するこの実

10

20

30

40

50

験において（平均6.5cmの高さ）、1つの植物あたり少数の葉のみ（一般的に4～6枚）が収穫の時にGFP蛍光を示し、定量化のために回収された。

【0177】

各々の植物について回収した葉から得た凍結粉末からの全可溶性タンパク質抽出後に、定量化を実行した。結果および統計解析（表6および7）は、陽圧によってインフィルトレーションした植物におけるGFP発現が、この実験において使用される最も高い過剰圧力（2.5bar）でさえ、真空によってインフィルトレーションした植物におけるものよりも有意に低かったことを明らかに示す。使用した過剰圧力が高いほどインフィルトレーションした葉におけるGFP発現が高いという一般的傾向も現れた。

【0178】

第2の実験において使用される植物がより進行した発育ステージ（ステージ10、平均16.5cmの高さ）であり、一般的に第1の実験の間よりもインフィルトレーションが良好であることは既に指摘されていた。これは、効果的にTurboGFPを発現し、平均で第1の実験において得られた収率よりも2倍高いバイオマスの1単位あたりのTurboGFPの高い収率で各々の植物について回収された葉の数によって反映された。伸長した葉のみがこの方法でインフィルトレーションすることができ、他の方法によるよりも全体として少ないインフィルトレーションした葉をもたらすので、注射器によりインフィルトレーションした植物からより少ない材料が回収されたと指摘することは重要である。定量化データ（表8～10）は、3.0barの過剰圧力によりインフィルトレーションした植物におけるTurboGFP発現が、注射器または真空（トリトンなし）でインフィルトレーションした植物におけるものとは有意に異なっていなかったことを示す。2.0～3.0barにわたる圧力値によりインフィルトレーションした植物における発現における差異は、統計的に有意ではなかった。しかしながら、有意により低いGFP発現は1.5barによりインフィルトレーションした植物において観察された。接種物への0.01%のトリトンX-100の追加は、真空でインフィルトレーションした植物におけるTurboGFP蓄積の有意であるが中程度の増加（1つの植物あたり<15%の増加）を引き起こす。2.5barでの陽圧と併用して0.01%トリトンX-100を加える効果は明らかではなかった。

表6。95%の信頼区間による条件間の差異の分析

【表6】

条件	平均値	グループ	
V50	435.415	A	
OP2.5	258.117	B	
OP2.0	250.960	B	
OP1.5	230.440	B	C
OP1.0	229.236	B	C
OP0.5	167.226		C

【0179】

95%の信頼区間により各々のペアの学生のt検定を使用して、g凍結重量あたりの μ g GFPで表現されたGFP濃度に基づいたインフィルトレーション条件のグルーピング（同じ文字で接続していないレベルは有意に異なる）。

表7。95%の信頼区間による条件間の差異の分析

【表 7】

カテゴリー	LS 平均値	グループ	
V50	5.083	A	
OP2.0	3.213	B	
OP2.5	3.106	B	
OP1.5	2.740	B	C
OP1.0	2.571	B	C
OP0.5	2.066	C	

【 0 1 8 0 】

10

95%の信頼区間により各々のペアの学生のt試験を使用して、%TSPで表現されたGFP濃度に基づいたインフィルトレーション条件のグルーピング（同じ文字で接続していないレベルは有意に異なる）。

表 8。95%の信頼区間による条件間の差異の分析

【表 8】

条件	平均値	グループ	
V50トリトンあり	790.751	A	
V50	723.700	B	
注射器	649.413	C	
OP3.0	627.456	C	D
OP2.5トリトンあり	606.548	C	D
OP2.0	601.443	C	D
OP3.5	580.485	D	
OP2.5	576.924	D	
OP1.5	494.170	E	

20

【 0 1 8 1 】

95%の信頼区間により各々のペアの学生のt試験を使用して、インフィルトレーションした葉のマイクログラムGFP/g凍結重量に基づいたインフィルトレーション条件のグルーピング（同じ文字で接続していないレベルは有意に異なる）。

30

表 9。95%の信頼区間による条件間の差異の分析

【表 9】

条件	平均値	グループ	
V50トリトンあり	18.637	A	
V50	15.923	B	
OP3.0	14.760	B	C
注射器	13.777	B	C
OP3.5	13.377	C	
OP2.0	13.093	C	D
OP2.5トリトンあり	13.065	C	D
OP2.5	12.304	C	D
OP1.5	10.610	D	

40

【 0 1 8 2 】

95%の信頼区間により各々のペアの学生のt試験を使用して、1つの植物あたりのmg GFPに基づいたインフィルトレーション条件のグルーピング（同じ文字で接続していないレベルは有意に異なる）。

表 10。95%の信頼区間による条件間の差異の分析

50

【表 10】

条件	平均値	グループ
V50 トリトンあり	9.668	A
V50	8.618	B
注射器	8.514	B
OP3.0	7.891	B C
OP2.5 トリトンあり	7.535	C D
OP2.0	7.214	C D
OP2.5	6.857	D
OP3.5	6.679	D E
OP1.5	5.785	E

10

【0183】

95%の信頼区間により各々のペアのペアの学生t検定を使用して、TSP濃度のパーセントにおけるGFP濃度に基づいたインフィルトレーション条件のグルーピング（同じ文字で接続していないレベルは有意に異なる）。

【0184】

結論

使用されるバイオマスがアグロ-インフィルトレーションのために現在使用した発育ステージ（ステージ10、5～6週齢の植物、約15cmの高さ、よく伸長した葉および最大1つの開いた花）に到達した場合、丸のままN・ベンサミアナ植物のアグロ-インフィルトレーションのための2.0～3.0barの間の過剰圧力の効率および組換えTurboGFPの一過性の発現は、バキュームインフィルトレーションの現在使用される方法のものに匹敵する。1.5bar以下の過剰圧力が使用された場合、またはインフィルトレーションのために使用された植物がより若い発育ステージ（すなわちステージ8）であった場合、過剰圧力によるインフィルトレーションの効率は、真空によるインフィルトレーションよりも低かった。

20

【0185】

3.5barという高い陽圧の使用についての植物ストレスの目視可能な兆候に関する有害効果は、インフィルトレーション後の回収およびインキュベーションの間に観察されなかった。

30

【0186】

特注の機器を使用する可能性を考慮すると、過剰圧力が圧縮空気によってタンクへもたらされ、完全真空サイクルは平均で4～5分間とるが、インフィルトレーションそれ自体がほぼ瞬間的であるので（本明細書において陽圧は10秒間維持された）、過剰圧力はインフィルトレーションサイクル時間をかなり減少させる能力を有する。

【0187】

インフィルトレーション溶液への0.01%のトリトンの追加は、2.5barの試験圧力では過剰圧力によるインフィルトレーションの効率を改善しなかった。しかしながら、バキュームインフィルトレーションの間の同じ濃度のこのデタージェントの使用は、インフィルトレーションした葉におけるGFPの発現の有意な増加を引き起こした。

40

【0188】

パートB：ニコチアナ・タバカムによる陽圧を使用するインフィルトレーション

【0189】

実施例10：手順および方法

バキュームインフィルトレーションおよび陽圧を使用する本発明の方法の直接比較を3つのタバコ品種について行なった。この実験において、合計150のタバコ植物（各々のタバコ品種あたり50）を標準的温室条件（24 および20時間の光）下で発芽および成長させた。N・タバカム植物を、タバコウイルスからのサイレンシング抑制因子（SoS

50

）と組み合わせて緑色蛍光タンパク質 TurboGFP を含むアグロバクテリウム培養 (Ag11) により形質転換した。バキュームインフィルトレーションは、一般に使用される条件のセット (50 mbar、60 秒の保持時間) および 7 つの異なる陽圧条件を使用して適用された。特に、2 つの因子 (陽圧値 [1.5 ~ 4.5 bar] および圧力サイクルの数 (「パルス」) [1 ~ 8]) を検査し、その一方で圧力保持時間 / パルスを 1 秒に維持して全プロセス時間を最小に維持する。

【0190】

インフィルトレーションした植物をインフィルトレーションの 5 日後に収穫し、GFP 発現を定性的および定量的に分析した。GFP の定性的な推測をインフィルトレーション後に青色光下で葉を撮影することによって実行した。葉における GFP 存在量の定量的分析を、ブルーオプティカルキット (励起: 490 nm / 放射: 510 ~ 570 nm) による蛍光モードにおいてモジュラスマイクロプレートリーダー (Turner Biosystems) で蛍光測定によって決定した。約 80 mg の葉ディスクを、すべての処理された植物について 1 つの植物あたり 3 枚の葉 (位置 1 ~ 3 から完全に伸長した葉が 0 であることは茎頂端分裂組織を示す) からパンチャーにより回収した。単一の植物の 3 枚の葉からのサンプルをプールし、次いで 1 mL の GFP 抽出緩衝液 (50 mM トリス、1 mM EDTA、100 mM NaCl、0.2% トリトン X-100、pH 7.5) の存在下において約 2.5 分間 Tissue Lysar (Qiagen) 中で破碎した。10 μ L の上清を GFP 抽出緩衝液により 1 : 20 に希釈し、蛍光を定量化した。市販の Evrogen tGFP タンパク質により作製したスタンダードカーブを使用して、GFP 濃度を計算した。抽出緩衝液中で 1 : 40 に希釈した GFP 不含有葉の抽出物に異なる量の TurboGFP 対照タンパク質 (TurboGFP、Evrogen #FP552) を加えることによって、スタンダードカーブを調製した。

【0191】

10.1 結果

各々の品種について個別の 2 要因 ANOVA を行なって、蛍光平均値の均等性を試験し、相互作用および主効果の有意な証拠があるかどうかをチェックする。0.05 のレベル (第 1 種の過誤についての標準的レベルのリスク) についての圧力 * パルス相互作用の有意な証拠はないが、植物 1 および植物 2 については圧力およびパルスの主効果、および植物 3 については圧力主効果のみの有意な証拠があった。モデルから相互作用項を省いて付加モデルも計算したが、妥当な差異はなかった。植物 1 は、4.5 bar の圧力および 8 パルスのサイクルについての蛍光平均値の間で有意により高い差異を示した。シンプル ANOVA を使用して、最適条件からの蛍光測定をバキューム法を使用して得られた参照測定と比較する (表 11 を参照)。p 値および観察された反応値の変動量から (R² および調整された R²、表 10 を参照されたい)、植物 2 について、参照との統計的に有意な差異があることが推論される。

表 11

【表 1 1】

植物3 vs 参照	源	DF	SS	MS	F	P
	圧力	1	1103834	1103834	0.10	0.754
	誤差	8	84243951	10530494		
	合計	9	85347785			
	S = 3245 R-Sq = 1.29% R-Sq(adj) = 0.00%					
植物 1 vs 参照	源	DF	SS	MS	F	P
	圧力	1	69691378	69691378	1.21	0.308
	誤差	7	403771649	57681664		
	合計	8	473463026			
	S = 7595 R-Sq = 14.72% R-Sq(adj) = 2.54%					
植物 2 vs 参照	源	DF	SS	MS	F	P
	圧力	1	351389652	351389652	6.74	0.036
	誤差	7	365030615	52147231		
	合計	8	716420267			
	S = 7221 R-Sq = 49.05% R-Sq(adj) = 41.77%					

10

【 0 1 9 2 】

比較は、0.05のファミリー誤差率により第1種の過誤の率を制御して、平均値間の差異についての信頼区間を採用することによってさらに調べられる。圧力0.05（真空）および4.5（過剰圧力）の区間は両者ともエンドポイントとして0を有し、これらの差異がこの特定の事例において過剰圧力が最も良好であることが有意であると示す。

20

表 1 2

【表 1 2】

植物2 最 適条件 vs 参照	レベル	下部	中央	上部	-----+-----+-----+-----+
	0.05	-21753	-12575	0	(-----*-----)
	4.50	0	12575	21753	(-----*-----)
					-----+-----+-----+-----+--+
					-1200 0 0 12000 24000

30

【 0 1 9 3 】

上記の観察は定性的なGFP定量化によって確認され、それはより高い圧力および増加したパルス数がより高いGFP発現を引き起こすことを視覚的に認識することができる。

【 0 1 9 4 】

図2、3および4中に示される2D等高線図は、実験と同じ範囲に関する反応等高線図において、2つの因子にわたり、予測された蛍光応答値を示した（すなわち、外側の範囲の予測はない）。

【 0 1 9 5 】

10.2 結論

データは、バキューム法の使用によって得られた測定と比較して、4.5 barの過剰圧力および8パルスのサイクルで、植物2についての有意に高い蛍光測定を示す。圧力およびパルスを増加させた場合、3つのN.タバカム品種は蛍光測定の増加を示し、このことは、圧力および圧力サイクル数を増加させることがインフィルトレーション効率を改善するという結論を導く。

40

【図1】

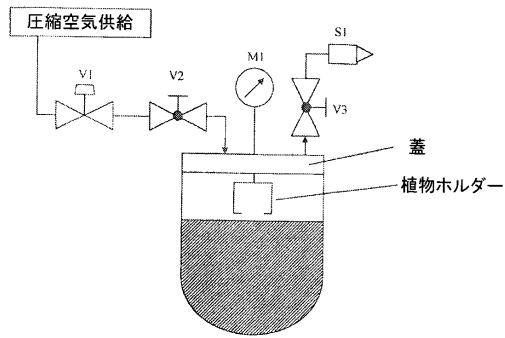


Figure 1

【図2】

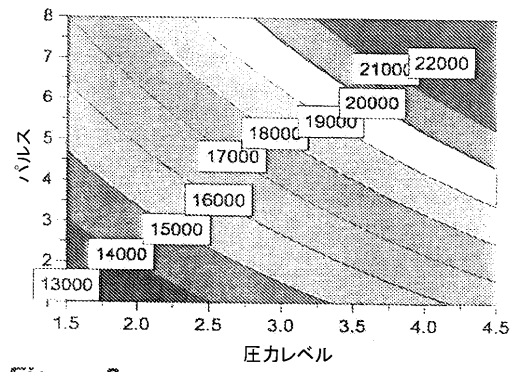


Figure 2

【図3】

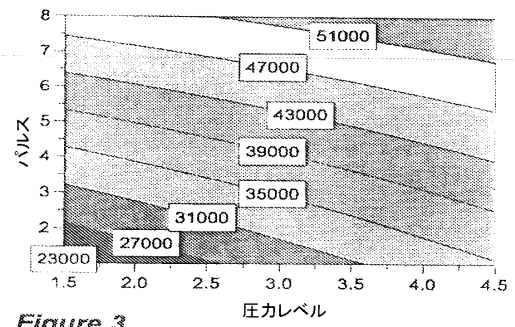


Figure 3

【図4】

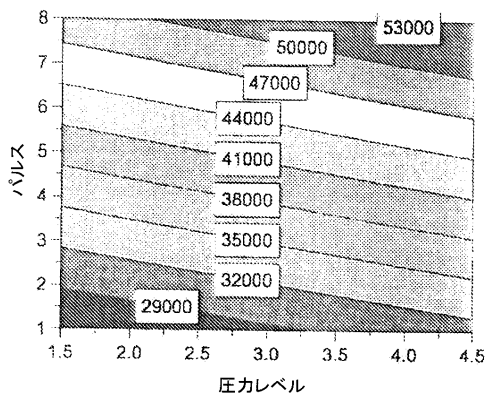


Figure 4

【図5】

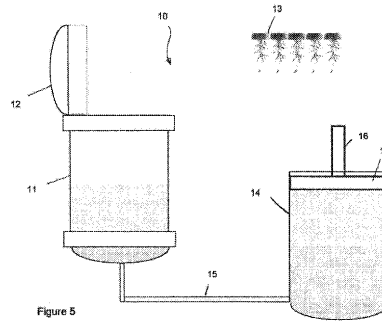


Figure 5

【図6】

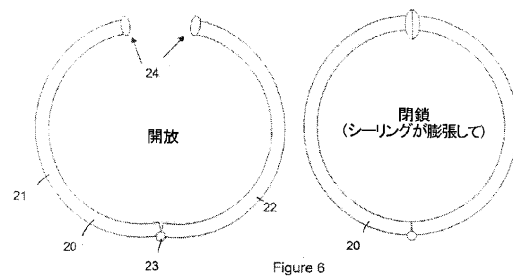
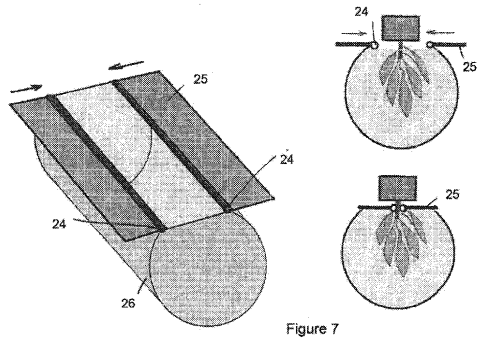


Figure 6

【 図 7 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100109335
弁理士 上杉 浩
- (72)発明者 カッターロ アンドレア
スイス ツェーハー 3 2 3 2 インス レーブシュトックヴェーク 5 1
- (72)発明者 フォークナー ジョン
スイス ツェーハー 2 0 2 3 ゴルジエ リュー ド ラ ガール 2 4
- (72)発明者 クリプフェル ヨリック
スイス ツェーハー 1 1 1 3 サン - サフォラン - シュル - モルジュ シュマン デュ プティ -
ボワ 1 6
- (72)発明者 ミロノフ オレグ
スイス ツェーハー 2 0 0 0 ヌーシャテル リュー デ バティユー 1
- (72)発明者 オーイシ カレン
スイス ツェーハー 2 0 0 0 ヌーシャテル リュー デ バティユー 1 5
- (72)発明者 ロシュティ サンドリーヌ
スイス ツェーハー 1 4 2 2 グランソン エ マール ヴィーニュ 6

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 7 1 6 9 (WO, A 1)
国際公開第 9 9 / 0 4 8 3 5 5 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 9 / 0 9 5 1 8 3 (WO, A 1)
国際公開第 0 1 / 0 1 2 8 2 8 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 9 / 0 1 1 7 2 6 (WO, A 1)
米国特許第 0 5 6 1 1 1 7 2 (US, A)
Kapila et al, Plant Science, 1 9 9 7 年, Vol. 122, p. 101-108

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
C 1 2 N 1 5 / 0 0
A 0 1 H 1 / 0 0 - 1 7 / 0 0
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
DWPI(Thomson Innovation)