(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2010-41997
(P2010-41997A)
(43)公開日　平成22年2月25日(2010.2.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	2B030
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	ZNAC	4B024
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	C	4B064
A01H 1/00	(2006.01)	A01H	1/00	A	4B065
A01H 5/00	(2006.01)	A01H	5/00	A	

審査請求 未請求　請求項の数 10　ＯＬ　（全 26 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-167773 (P2009-167773)
(22)出願日　平成21年7月16日 (2009.7.16)
(31)優先権主張番号　特願2008-184479 (P2008-184479)
(32)優先日　平成20年7月16日 (2008.7.16)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　000002093
住友化学株式会社
東京都中央区新川二丁目２７番１号
(74)代理人　110000202
新樹グローバル・アイピー特許業務法人
(72)発明者　汀　恵子
兵庫県宝塚市高司四丁目２番１号　住友化学株式会社内
(72)発明者　松嶋　隆
兵庫県宝塚市高司四丁目２番１号　住友化学株式会社内
(72)発明者　長澤　秋都
兵庫県宝塚市高司四丁目２番１号　住友化学株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】外来タンパク質の分泌方法

(57)【要約】
【課題】
本発明は、植物を用いた外来タンパク質の製造において、当該外来タンパク質を植物細胞外に分泌させる方法を提供する。
【解決手段】
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡを、
植物のゲノムに導入することを特徴とする、
前記外来タンパク質の前記植物細胞外への分泌方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡを、
植物細胞のゲノムに導入し発現させることを特徴とする、
前記外来タンパク質の前記植物細胞外への分泌生産方法。
【請求項２】
ＤＮＡが、グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に１つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡである請求項１に記載方法。
【請求項３】
１つのアミノ酸が、セリン、アラニンまたはメチオニンである請求項２に記載の分泌方法。
【請求項４】
グリシニン小胞体輸送シグナル配列が配列番号１で示されるアミノ酸配列である請求項１～３のいずれかに記載の分泌方法。
【請求項５】
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡを宿主植物細胞のゲノムに導入することを特徴とする、外来タンパク質を細胞外へ分泌する組換え植物細胞の製造方法。
【請求項６】
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡ
を含有する植物発現プラスミド。
【請求項７】
ＤＮＡが、グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に１つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡである請求項６に記載のプラスミド。
【請求項８】
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡ。
【請求項９】
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡが
ゲノムに導入された植物細胞。
【請求項１０】
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡが
ゲノムに導入された植物またはその種子。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、植物細胞を用いて、タンパク質を細胞外に分泌生産させる方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
外来タンパク質遺伝子を植物細胞に導入して大量に発現させる場合、宿主細胞への負荷を低減させるための方策の一つとして、発現した外来タンパク質を細胞外アポプラストに分泌させ蓄積させる方法が考えられる。
細胞外アポプラストに外来タンパク質を分泌させるための方法としては、外来タンパク質をそのアミノ末端に小胞体輸送シグナル配列が連結された融合タンパク質として発現させる方法が挙げられる。小胞体輸送シグナル配列は、連結されたタンパク質を小胞体内腔へ透過させる機能を有しており、小胞体輸送シグナル配列と外来タンパク質とは、小胞体膜中でシグナルペプチダーゼによって切り離され、外来タンパク質が小胞体内腔に放出される。外来タンパク質は小胞体内腔でフォールディングされた後、細胞内輸送系によって細胞外アポプラストへと分泌される。
グリシニンはダイズ種子貯蔵タンパク質であり、小胞体輸送シグナル配列を有するプログリシニン前駆体として翻訳された後、小胞体膜中でグリシニン小胞体輸送シグナル配列が切除されてプログリシニンとなる。プログリシニンは小胞体中で三量体を形成してタンパク質貯蔵型液胞へと輸送され、プロセシングを受けて成熟型グリシニンとなり六量体を形成する。例えば、Ｍａｒｕｙａｍａら（非特許文献１）は、ダイズ未熟種子で緑色蛍光タンパク質（以後、ＧＦＰと表記することがある）を一過的に発現させる実験において、グリシニン小胞体輸送シグナル配列にプログリシニンアミノ末端由来の９アミノ酸を付加してＧＦＰと連結し発現させた場合にのみ、ＧＦＰは細胞外アポプラストに分泌されたと報告している。Ｋａｗａｇｏｅら（非特許文献２）は、組換えイネ未熟種子でＧＦＰを発現させる実験において、グリシニン小胞体輸送シグナル配列にプログリシニンアミノ末端由来の２アミノ酸及び更にいくつかのアミノ酸を付加してＧＦＰと連結し発現させた場合に、ＧＦＰは細胞外アポプラストに分泌されなかったと報告している。
有用タンパク質生産において、例えば、目的とする外来タンパク質の酵素活性や生理作用等の本来の有用な性質を保持させるためには、生産される外来タンパク質は、付加的な異種配列を有さないか、付加的な異種配列を有してもそれは短いことが好ましい。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００３】
【非特許文献１】Ｍａｒｕｙａｍａら、Ｔｈｅ　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ、２００６年、Ｖｏｌ．１８、ｐ．１２５３－１２７３
【非特許文献２】Ｋａｗａｇｏｅら、Ｔｈｅ　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ、２００５年、Ｖｏｌ．１７、ｐ．１１４１－１１５３
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
本発明は、植物細胞を用いた外来タンパク質の生産において、グリシニン小胞体輸送シグナル配列を用いて目的とする外来タンパク質を細胞外アポプラストに分泌させるための改良された方法を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本発明は以下の項１～１０等を提供するものである。
［項１］
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タ

ンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡを、
植物細胞のゲノムに導入し発現させることを特徴とする、
外来タンパク質の植物細胞外への分泌生産方法。
［項２］
ＤＮＡが、グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に１つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡである前記項１に記載の方法。
［項３］
１つのアミノ酸が、セリン、アラニンまたはメチオニンである前記項２に記載の方法。
［項４］
グリシニン小胞体輸送シグナル配列が配列番号１で示されるアミノ酸配列である前記項１～３のいずれかに記載の方法。
［項５］
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡを宿主植物細胞のゲノムに導入することを特徴とする、外来タンパク質を細胞外へ分泌する組換え植物細胞の製造方法。
［項６］
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡ
を含有する植物発現プラスミド。
［項７］
ＤＮＡが、グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に１つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡである前記項６に記載のプラスミド。
［項８］
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡ。
［項９］
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡが
ゲノムに導入された植物細胞。
［項１０］
グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列をコードするＤＮＡが
ゲノムに導入された植物またはその種子。
【発明の効果】
【０００６】
本発明によれば、植物を用いた外来タンパク質の製造において、目的とする外来タンパク質に、比較的長い異種ペプチドを付加することなく、当該タンパク質を、機能可能な形で細胞外アポプラストに分泌させることが可能となる。

【図面の簡単な説明】
【０００７】
【図１】pSUM-35S-GY1SP　S-GFPの構造模式図である。
【図２】pSUM-35S-GY1SP-GFPの構造模式図である。
【図３】pSUM-35S-GY1SP　M-GFPの構造模式図である。
【図４】pSUM-35S-GY1SP　A-GFPの構造模式図である。
【図５】pSUM-35S-GY1SP　S-Lip1soyの構造模式図である。
【図６】pSUM-35S-Lip1soyの構造模式図である。
【図７】pBI-35S-GY1SP　S-Lip1soyの構造模式図である。
【図８】pBI-35S-Lip1soyの構造模式図である。
【図９】リパーゼ遺伝子転写レベルを示すグラフである。
【図１０】ウエスタンブロット法でリパーゼタンパク質を検出した結果を示す画像であるである。
【図１１】pBI-35S-GY1SP　S-Lip1soyプラスミド導入タバコを分画してウエスタンブロット法でリパーゼタンパク質を検出した結果を示す画像である。
【図１２】pSUM-GY1-GY1SP　S-Lip1soyの構造模式図である。
【図１３】ウエスタンブロット法でリパーゼタンパク質を検出した結果を示す画像である。
【発明を実施するための形態】
【０００８】
以下に本発明を詳細に説明する。
【０００９】
本発明において植物細胞外とは、植物細胞膜外を意味する。本発明において細胞外アポプラストとは植物細胞膜外領域を意味し、導管または木部、細胞壁、細胞間隙等を包含し、培養細胞の場合は、培地をも意味する。
本発明において分泌とは、外来タンパク質を細胞外アポプラストに輸送することである。
一般に、細胞外アポプラストは、タンパク質は少なく、主に水とイオンで構成されているので、細胞外アポプラストには、高濃度の外来タンパク質を蓄積することができる。
【００１０】
本明細書中、
「グリシニン小胞体輸送シグナル配列と
当該シグナル配列に直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された外来タンパク質のアミノ酸配列と
を含有するアミノ酸配列」
を、「本発明で用いられるアミノ酸配列」と称する場合がある。
また、当該「本発明で用いられるアミノ酸配列」をコードするＤＮＡを、「本発明で用いられるＤＮＡ」と称する場合がある。
当該「本発明で用いられるＤＮＡ」は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。
「本発明で用いられるアミノ酸配列」は、下記の（１）または（２）で示される構造を含有する。
なお、本明細書中、アミノ酸配列は、Ｎ－末端からＣ－末端の方向に記載される。
【００１１】
（１）グリシニン小胞体輸送シグナル配列－外来タンパク質のアミノ酸配列
（２）グリシニン小胞体輸送シグナル配列－１つもしくは２つのアミノ酸－外来タンパク質のアミノ酸配列
【００１２】
本発明においてグリシニン小胞体輸送シグナル配列とは、プログリシニン前駆体のＮ－末端に存在する小胞体輸送シグナル配列である。グリシニンには５つのサブユニット（Ｇ１～Ｇ５）が存在し、各サブユニットの小胞体輸送シグナル配列は公知である（Ｎｉｅｌ

ｓｅｎ ｅｔ ａｌ、Ｔｈｅ Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ（１９８９）Ｖｏｌ．１、ｐｐ３１３－３２８）（配列番号１～５）。本発明におけるグリシニン小胞体輸送シグナル配列は、好ましくは配列番号１～５のいずれかで示されるアミノ酸配列であるが、グリシニン小胞体輸送シグナル配列としての機能を有するものであれば特に限定されず、例えば将来発見されるグリシニン小胞体輸送シグナル配列および変異種のグリシニン小胞体輸送シグナル配列を包含する。本発明におけるグリシニン小胞体輸送シグナル配列は、最も好ましくは配列番号１で示されるアミノ酸配列である。

【００１３】

Ｇ１：MAKLVFSLCFLLFSGCCFA（配列番号１）
Ｇ２：MAKLVLSLCFLLFSGCFA（配列番号２）
Ｇ３：MAKLVLSLCFLLFSGCCFA（配列番号３）
Ｇ４：MGKPFTLSLSSLCLLLLSSACFA（配列番号４）
Ｇ５：MGKPFFTLSLSSLCLLLLSSACFA（配列番号５）

【００１４】

本発明において外来タンパク質とは、宿主植物のゲノムにその構造遺伝子を導入することによって産生させることを意図するタンパク質を意味する。すなわち、当該「外来タンパク質」は、宿主植物が本来産生しないタンパク質のみならず、宿主植物が元々産生するタンパク質も包含する。グリシニン小胞体輸送シグナル配列と直接連結される場合には、当該「外来タンパク質」はグリシニン以外のタンパク質である。

本発明において外来タンパク質は、好ましくは成熟型タンパク質である。また、本発明において外来タンパク質は、好ましくは植物細胞内での発現に適したタンパク質である。本発明は、例えば、大腸菌等の原核生物細胞内で発現させた場合には正しく折りたたまれず、植物細胞内で発現させると機能可能な形に折りたたまれるタンパク質の生産に適する。「外来タンパク質」として、産業上有用なタンパク質を挙げることもでき、具体的には、産業用酵素、ワクチン、生理活性物質、および抗体などが挙げられる。さらに具体的には、産業用酵素としてリパーゼ（例えば、Ｌｏｎｇｈｉ ｅｔ ａｌ、１９９２、Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ（１９９２）Ｖｏｌ．１１３１（２）、ｐｐ２２７－２３２参照）、アミラーゼ、ペクチナーゼ、β－グルカナーゼ、フィターゼ、ラクターゼなど；ワクチンとしてニワトリニューキャッスル病ワクチン、ブタ浮腫病ワクチン、ブタ原虫病ワクチン、Ｂ型肝炎ウイルスワクチンなど；生理活性物質として造血因子、ホルモン、インターフェロン類など；抗体として免疫グロブリンなどが挙げられる。

本発明において外来タンパク質は、好ましくは、細胞外への分泌効率を低下させる配列を有さない。その例として、具体的には、そのＣ－末端に小胞体保留シグナル、日本特許公開２００３－３３４０８０のクレームの各配列などが挙げられる。

本発明において外来タンパク質は、好ましくは、ダイズグリシニンタンパク質以外のタンパク質である。

【００１５】

これらのタンパク質のアミノ酸配列は、慣用のタンパク質工学技術および遺伝子工学技術を用いて取得するか、あるいは当該技術分野で利用可能な種々のデータベースから取得することができる。得られたアミノ酸配列から、これをコードするＤＮＡの塩基配列を得ることは当業者にとって容易である。

【００１６】

本発明において、グリシニン小胞体輸送シグナル配列と外来タンパク質のアミノ酸配列とは、直接にまたは１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結される。当該２つの配列は、所望の外来タンパク質の種類にもよるが、多くの場合で、分解されること無く得られる外来タンパク質の収率の観点から、好ましくは、１つもしくは２つのアミノ酸を介して、より好ましくは、１つのアミノ酸を介して連結される。当該「１つのアミノ酸」、および「２つのアミノ酸（すなわち、２アミノ酸配列）」は、特に限定されず、具体的には、例えば、セリン、アラニン、およびメチオニン等の１つのアミノ酸が用いられる。当該「２

つのアミノ酸は」、好ましくはＦＳ（Phe-Ser）ではない。

【００１７】

「本発明で用いられるＤＮＡ」は、慣用の遺伝子工学技術を用いて調製することができる。例えば、塩基配列に基づいて「本発明で用いられるＤＮＡ」を化学的に全合成してもよく、グリシニン小胞体輸送シグナル配列（または当該配列に１つもしくは２つのアミノ酸をコードする塩基配列を付加した配列）からなるＤＮＡに外来タンパク質をコードするＤＮＡを、慣用の遺伝子工学技術を用いてイン・フレームに連結してもよい。より具体的には、例えば、実施例に記載の方法に準じて調製することができる。

【００１８】

本発明の分泌方法では、前記で説明した「本発明で用いられるＤＮＡ」を、植物のゲノムに導入する。

当該導入方法としては、慣用の遺伝子工学方法を用いればよい。例えば、本発明で用いられるＤＮＡを含有する植物発現プラスミドを、宿主植物に適した遺伝子細胞工学的手法を用いて導入すればよい。このような手法としては、例えば、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、およびリン酸カルシウム法等がある。

【００１９】

本発明で用いられるＤＮＡを含有する植物発現プラスミドは、採用する遺伝子導入法に応じて、例えば、ｐＢＩ１０１、ｐＢＩ１２１などのＴｉプラスミド由来のベクター、またはＲｉプラスミド由来のベクター等、あるいはｐＢＩ２２１などの通常のｐＵＣ系大腸菌プラスミドなどが利用可能であり、慣用の遺伝子工学方法により作成することができる。

【００２０】

当該植物発現プラスミドは、本発明の融合タンパク質を発現させるためのプロモーター及びターミネーターを含有する。

当該プロモーターとしては、植物で機能可能なプロモーターであれば、特に限定されず、例えば、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター（国際公開８４／０２９１３）、ユビキチンプロモーター（国際公開０１／０９４３９４）、アクチンプロモーター（国際公開００／０７００６７）等の恒常的プロモーター、ダイズ種子グリシニンプロモーター（日本特許第３７１１５６４号）、ニンジンＣＲ１６Ｇ１プロモーター（日本特許公開平１０－０５２２７３）、インゲンマメファゼオリンプロモーター（国際公開９１／０１３９９３）などの組織特異的プロモーター、副腎皮質ホルモン応答性プロモーター（Ａｏｙａｍａ Ｔ ＆ Ｃｈｕａ ＮＨ、１９９７、Ｐｌａｎｔ Ｊ．１１、６０５－６１２； 米国特許第６０６３９８５号）、エタノール応答性プロモーター（Ｃａｄｄｉｃｋ ＭＸ ｅｔ ａｌ、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ． １６、１７７－１８０； 国際公開９３／２１３３４）等の化学物質誘導系プロモーターなどが挙げられる。

前記ターミネーターとしては、植物で機能可能なターミネーターであれば、特に限定されず、例えば、ＮＯＳターミネーター（国際公開８４／０２９１３）、ダイズ種子グリシニンターミネーター（日本特許公開０６－１８９７７７）、ニンジンＣＲ１６ターミネーター（日本特許公開２０００－１６６５７７）等が挙げられる。

また、前記植物発現プラスミドは、栄養選択性マーカーまたは薬剤耐性マーカー等の選択マーカーを含有してもよい。

本発明で用いられるＤＮＡがゲノムに導入された細胞は、形質導入した薬剤（例、カナマイシン）耐性等によって選択および純化することができる。

【００２１】

植物発現プラスミドが植物ゲノムに組み込まれることにより、細胞分裂後の娘細胞のゲノム中に外来タンパク質のＤＮＡ配列が確実に伝達され、後代でも安定的に遺伝子発現させることが可能となる。

【００２２】

宿主植物細胞、すなわち本発明で用いられるＤＮＡをそのゲノムに導入する植物の細胞

としては、遺伝子導入法、組織培養法、細胞またはカルスからの再分化技術、および栽培技術等が確立している植物の細胞が好ましい。また、このような植物としては、農業等、産業上重要な種やゲノム解析など研究において有用な種が好ましい。このような植物として具体的には、例えば、ダイズ、インゲンマメ、エンドウマメ、ピーナッツ、ヒマ、イネ、トウモロコシ、ワタ、ナタネ、コムギ、オオムギ、キュウリ、ナス、ニンジン、ジャガイモ、サトイモ、サツマイモ、カボチャ、ニンニク、タマネギ、スギ、マツ、ヤナギ、ポプラ、ユーカリ、タバコ、ミヤコグサ、アルファルファ、シロツメグサ、シロイヌナズナ、ソルガム、ゴマ、ヒマワリ、キクイモ、スイッチグラス、ススキ、ナンヨウアブラギリ、アブラヤシ、ココヤシ、オリーブ、サトウキビ、テンサイ、キャッサバ、ケナフ等が挙げられる。

【００２３】

本発明で用いられるＤＮＡがゲノムに導入された細胞は、ＭＳ培地等を用いて、適当な条件下で増殖させることができ、また慣用の再分化方法により、本発明で用いられるＤＮＡが導入された植物（体）を得ることができる。さらに、当該植物から、その種子を得ることができる。

本発明で用いられるＤＮＡがそれぞれゲノムに導入された細胞、植物、および種子もまた、本発明の範囲内である。

【００２４】

これらの、本発明の植物細胞、または本発明の植物に目的とする外来タンパク質を発現、分泌させることにより、目的とする外来タンパク質を生産することができる。発現、分泌された外来タンパク質の回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせて行うことができる。例えば、本発明の植物細胞の培養液や、本発明の植物細胞もしくは植物の破砕液を回収し、目的とする外来タンパク質を含む画分として用いることができる。本発明の植物細胞の培養終了後、培養液を遠心分離して培養上清画分を回収することにより、目的とする外来タンパク質を含む画分を得ることもできる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製された目的とする外来タンパク質を回収することもできる。

【００２５】

本発明において、目的外来タンパク質が蓄積している細胞外アポプラスト液を回収する方法は、目的とする宿主に適したタンパク質工学的手法として実験書（例えば、「植物のタンパク質実験プロトコール、遺伝子と組織から迫るタンパク質の機能と構造」　中村研三他監修、１９９８年、秀潤社、ＩＳＢＮ　４－８７９６２－１８０－３等）や文献（例えば、Ｂｏｅｒｎｋｅら、Ｐｌａｎｔａ（２００２）Ｖｏｌ．２１４、ｐｐ３５６－３６４参照）に記載の方法を用いることができる。例えば、１Ｍ塩化ナトリウムや１Ｍ塩化カリウム等、塩強度の高い緩衝液を減圧吸引させ、低速遠心分離によって細胞外アポプラスト液を容易に回収することができる。

【００２６】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例１】

【００２７】

（グリシニン小胞体輸送シグナル配列（ＧＹ１ＳＰ）を有するＧＦＰ発現プラスミドの構築）

オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質（以下、ＧＦＰと記すことがある。）を植物で発現させるために、グリシニン小胞体輸送シグナル配列（以下、ＧＹ１ＳＰと記すことがある。）をコードするＤＮＡと改変緑色蛍光タンパク質をコードするＤＮＡとをコドンのフレームが変わることなく（すなわち、イン・フレームで）連結された発現プラスミドを構築した。

【００２８】

（１）セリン残基連結型ＧＦＰ分泌発現プラスミド（ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ

－ＧＦＰ）の構築
まず、配列番号６で示される塩基配列を有する緑色蛍光タンパク質遺伝子を全合成した。これを鋳型に、配列番号７及び８で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてＰＣＲを行い、ＧＦＰをコードし、両末端に制限酵素ＮｈｅＩ及びＳａｃＩの認識配列をそれぞれ有するＤＮＡ断片を増幅した。ＰＣＲはＤＮＡポリメラーゼＫＯＤ －Ｐｌｕｓ－（東洋紡社製）を用いて、９４℃で２分間の保温を行った後、９４℃で３０秒間、次いで５０℃で３０秒間、さらに６８℃で６０秒間の保温を１サイクルとしてこれを３０回繰り返し、最後に６８℃で３分間の保温を行った。ＤＮＡ断片精製キットＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ －ＰＣＲ ＆ Ｇｅｌ Ｃｌｅａｎ ｕｐ－（東洋紡社製）を用いて増幅した断片を反応液から回収精製し、遺伝子クローニングキットＴａＫａＲａ ＢＫＬ Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）を用いてキット付属のプラスミドｐＵＣ１１８の制限酵素ＳｍａＩ切断部位にライゲーションした。これを大腸菌ＤＨ５α株のコンピテントセル（東洋紡社製）に導入してアンピシリン耐性株を選抜し、選抜耐性株のプラスミドの塩基配列を塩基配列解析用反応キットＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔａｏｒ ｖ３．１ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｋｉｔ（アプライドバイオシステムズ社製）及び塩基配列解析装置ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ ３１００ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｎａｌｙｚｅｒ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて解析した。正しい塩基配列を有するプラスミドを選抜し、このプラスミドを制限酵素ＮｈｅＩ及びＳａｃＩで消化してＮ－末端側にセリン残基を有するペプチドをコードする０．７ｋｂｐのＤＮＡ断片を得た。

【００２９】

配列番号６：5’-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCG
ACGTGAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC
TGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTA
CCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA
AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGC
CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACC
ACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTG
AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGA
CGAGCTGTACAAGTAA-3’

配列番号７：5'-gctagcgtgagcaagggcgaggagctgttcacc-3'
配列番号８：5'-gagctcttacttgtacagctcgtccatgccgtg-3'

【００３０】

次に、配列番号９及び１０で示される末端をリン酸化した合成オリゴヌクレオチドを等モル混合して６５℃で５分間加熱後に徐冷し、グリシニン小胞体輸送シグナル配列（配列番号１）をコードするリンカーを調製した。このリンカーとＮ－末端側にセリン残基を有するペプチドをコードする０．７ｋｂｐのＤＮＡ断片とを、制限酵素ＢａｍＨＩ及びＳａｃＩで消化したプラスミドｐＢＩ２２１（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｉｏｎ Ｎｕｍｂｅｒ ＡＦ５０２１２８）にライゲーションして同様に大腸菌に形質転換した。選抜株のプラスミドの塩基配列を確認し、配列番号１１で示される塩基配列を有し、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがセリン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ Ｓ－ＧＦＰ（図１）を得た。

【００３１】

配列番号９：5'-gatccatggccaagctagttttttccctttgttttctgcttttcagtggctgctgcttcg-3'
配列番号１０：5'-ctagcgaagcagcagccactgaaaagcagaaaacaaagggaaaaaactagcttggccatg-3'
配列番号１１：5'-GGATCCATGGCCAAGCTAGTTTTTTCCCTTTGTTTTCTGCTTTTCAGTGGCTGCTGCTTCGCT
AGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTGAACGGCCACAA
GTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
TGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG
CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA

CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG
ACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC
CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACG
AGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
GAGCTC-3'

【００３２】

（２）連結部位改変ＧＦＰ分泌発現プラスミドの構築

ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－ＧＦＰを鋳型に、配列番号１２で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとし、及び配列番号１３、配列番号１４、または配列番号１５で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを改変リバースプライマーとして１回目のＰＣＲを行った。次に、それぞれの反応液の一部を鋳型に、配列番号１２で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとし、及び配列番号１６で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして２回目のＰＣＲを行い、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとの連結部位のアミノ酸を変えた融合タンパク質をコードし、末端に制限酵素ＢａｍＨＩ及びＳａｃＩの認識配列を有するＤＮＡ断片を増幅した。

１回目のＰＣＲはＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＨＳ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ社製）を用いて、９８℃で１０秒間、次いで５５℃で５秒間、さらに７２℃で３０秒間の保温を１サイクルとしてこれを３０回繰り返した。２回目のＰＣＲは、７２℃での保温を６０秒間とした以外は、１回目のＰＣＲと同様の条件とした。

増幅したＤＮＡ断片をそれぞれ回収精製して制限酵素ＢａｍＨＩ及びＳａｃＩで消化し、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－ＧＦＰの制限酵素ＢａｍＨＩ及びＳａｃＩ切断部位に置換挿入することにより、以下のプラスミドを得た。

即ち、改変リバースプライマーとして配列番号１３で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとが付加的なアミノ酸残基を介さずに直接連結された融合タンパク質を発現するプラスミドｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ－ＧＦＰ（図２）を得た。

また、改変リバースプライマーとして配列番号１４で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがメチオニン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｍ－ＧＦＰ（図３）を得た。

さらに、改変リバースプライマーとして配列番号１５で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがアラニン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ａ－ＧＦＰ（図４）を得た。

【００３３】

配列番号１２：5'-gagtcaggatccatggccaagctagttttttcc-3'
配列番号１３：5'-cttgctcacagcgaagcagcagcc-3'
配列番号１４：5'-cttgctcaccatagcgaagcagcagcc-3'
配列番号１５：5'-cttgctcacagcagcgaagcagca-3'
配列番号１６：5'-gttcgagagctcttacttgtacagctcgtccat-3'

【００３４】

改変リバースプライマーとして配列番号１７で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがグリシン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。

改変リバースプライマー配列番号１８で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがロイシン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。

改変リバースプライマー配列番号１９で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

を用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがイソロイシン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２０で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがバリン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２１で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがプロリン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２２で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがトレオニン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２３で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがヒスチジン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２４で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがグルタミン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２５で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがグルタミン酸残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２６で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがアスパラギン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２７で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがアスパラギン酸残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２８で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがリシン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号２９で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがシステイン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号３０で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがアルギニン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号３１で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがチロシン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマーとして配列番号３２で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがトリプトファン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマーとして配列番号３３で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがフェニルアラニン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号３４で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがセリン残基－グリシン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。
改変リバースプライマー配列番号３５で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがセリン残基－アラニン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。

改変リバースプライマー配列番号３６で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとがアラニン残基－グリシン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドを得る。

【００３５】

配列番号１７：5'-cttgctcacgccagcgaagcagca-3'
配列番号１８：5'-cttgctcacaagagcgaagcagcagcc-3'
配列番号１９：5'-cttgctcacgatagcgaagcagcagcc-3'
配列番号２０：5'-cttgctcacaacagcgaagcagcagcc-3'
配列番号２１：5'-cttgctcacgggagcgaagcagca-3'
配列番号２２：5'-cttgctcacagtagcgaagcagcagcc-3'
配列番号２３：5'-cttgctcacgtgagcgaagcagca-3'
配列番号２４：5'-cttgctcacttgagcgaagcagcagcc-3'
配列番号２５：5'-cttgctcacttcagcgaagcagcagcc-3'
配列番号２６：5'-cttgctcacgttagcgaagcagcagcc-3'
配列番号２７：5'-cttgctcacatcagcgaagcagcagcc-3'
配列番号２８：5'-cttgctcaccttagcgaagcagcagcc-3'
配列番号２９：5'-cttgctcacgcaagcgaagcagca-3'
配列番号３０：5'-cttgctcactctagcgaagcagcagcc-3'
配列番号３１：5'-cttgctcacgtaagcgaagcagcagcc-3'
配列番号３２：5'-cttgctcacccaagcgaagcagca-3'
配列番号３３：5'-cttgctcacgaaagcgaagcagcagcc-3'
配列番号３４：5'-cttgctcacgccgctagcgaagca-3'
配列番号３５：5'-cttgctcacagcgctagcgaagcagca-3'
配列番号３６：5'-cttgctcacgccagcagcgaagca-3'

【００３６】

（３）感染導入用ＧＦＰ発現バイナリーベクターの構築

前記（１）及び（２）のプラスミドを、それぞれ、制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ及びＥｃｏＲＩで消化し、１．９ｋｂｐのＤＮＡ断片を得る。これらのＤＮＡ断片を、制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩ及びＥｃｏＲＩで消化したバイナリーベクタープラスミドｐＢＩ１２１（ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｉｏｎ　Ｎｕｍｂｅｒ　ＡＦ４８５７８３）にそれぞれライゲーションすることにより、ＧＹ１ＳＰとＧＦＰとが直接または１つもしくは２つのアミノ酸を介して連結された融合タンパク質を発現するバイナリーベクタープラスミドを得る。

【実施例２】

【００３７】

（組換えタバコ培養細胞におけるＧＦＰの発現解析）

（１）タバコ培養細胞へのＧＦＰ発現ベクターの導入及び組換え培養細胞の選抜

実施例１で作製した発現プラスミドを遺伝子導入装置ＰＤＳ－１０００／Ｈｅシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社製）を用いてタバコＢＹ－２懸濁培養細胞に導入した。遺伝子導入用培養細胞の調製は飯田ら（実験講座　遺伝子導入実験法１　－パーティクルガン法－、植物細胞工学、１９９２年、Ｖｏｌ．４、Ｎｏ．１、ｐｐ．４３－４８）の方法に従った。遺伝子導入操作の３～５日後に、培養細胞を３０ｍｇ／Ｌのカナマイシンを含み、０．８％寒天で固化した改変ＭＳ（ＭＳ無機塩類（Ｍｕｒａｓｈｉｇｅ　ａｎｄ　Ｓｋｏｏｇ，Ｐｈｙｓｉｏｌ．　Ｐｌａｎｔ．　（１９６２）　Ｖｏｌ．１５、ｐｐ４７３－４９３）、３％ショ糖、１μＭ　２，４－Ｄ、１ｍｇ／Ｌ　ｔｈｉａｍｉｎ－ＨＣｌ、１００ｍｇ／Ｌ　ｍｙｏ－ｉｎｏｓｉｔｏｌ、２００ｍｇ／Ｌ　KH_2PO_4）寒天培地に広げ、暗下、２３～２５℃で１ヶ月間培養してカナマイシン耐性細胞塊を選抜した。選抜した細胞塊を新たに２００ｍｇ／Ｌのカナマイシンを含む改変ＭＳ寒天培地で３週間培養し、増殖した細胞塊を同一組成の培地でさらに３～４週間、２回の培養を行って、組換え細胞株を確立した。その後、２００ｍｇ／Ｌのカナマイシンを含む改変ＭＳ液体培地で、暗下、２３～２５℃、１４０ｒｐｍで２週間の旋回培養を２回行い、組換え細胞を純化するとと

もに、それぞれの細胞株の増殖を安定させた。
以降、カナマイシン無添加の改変ＭＳ液体培地で同条件の旋回培養を行い、細胞増殖が飽和状態に達する直前に細胞重量０．３～０．４ｇを新しい培地に植え込み、継代培養した。
【００３８】
（２）組換えタバコ培養細胞におけるＧＦＰの分泌量解析
前述のようにして得た組換え培養細胞から細胞外である培地に分泌されたＧＦＰと細胞内に蓄積しているＧＦＰとをウエスタンブロット法及び免疫染色法を用いて定量し、ＧＦＰの分泌量を算出した。
旋回培養している組換え培養細胞の増殖速度が指数関数的に増加している段階のものを２０ｍＬ回収し、８，０００ｒｐｍ、室温、１０分間遠心分離を行い、培養上清と培養細胞を得た。培養上清は遠心式フィルターユニットＣｅｎｔｒｉｐｒｅｐ ＹＭ－１０（ミリポア社製）及びＭｉｃｒｏｃｏｎ ＹＭ－１０（ミリポア社製）を用いて液量が１／２００程度になるまで濃縮し、これを培地画分とした。培養細胞０．４ｇを液体窒素で凍結し、細胞重量と等量のガラスビーズ（０．２５～０．５ｍｍ）及びＰＢＳ緩衝液３００μＬを添加した後、ミキサーミルＭＭ－３００（ＱＩＡＧＥＮ社製）で細胞を破砕した。破砕物を１５，０００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離して回収された上清を再度４℃で５分間遠心分離して、得られた上清を全細胞画分とした。各タンパク質溶液の一部をサンプリングし、タンパク質呈色試薬Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｄｙｅ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社製）を用いて、ウシ血清アルブミン標品（Ｓｉｇｍａ社製）をスタンダードとしてタンパク質濃度測定を行った。
サンプル量と等量の試料緩衝液（２倍濃縮、２－メルカプトエタノール含有）（ナカライテスク社製）を混合し、１００℃、３分間の熱処理後に氷冷した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルとしてマルチゲルＩＩミニ（コスモ・バイオ社製）を用い、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動緩衝液（０．１％ ＳＤＳ、２５ｍＭ トリス、１９２ｍＭ グリシン）中でゲル１枚当たり３０ｍＡ、１時間泳動した。タンパク質検出・定量のスタンダードとしてリコンビナントＧＦＰ（コスモ・バイオ社製）を泳動した。泳動後、ゲルを転写緩衝液（０．０３７５％ ＳＤＳ、４８ｍＭ トリス、３９ｍＭ グリシン、２０％ メタノール）で１５分間、室温で緩やかに振とうし、トランスブロットＳＤセル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社製）を用いてＰＶＤＦメンブレンであるイモビロン－Ｐ（ミリポア社製）に１０Ｖ、１時間で転写した。転写後、洗浄緩衝液（０．１％ Ｔｗｅｅｎ含有ＴＢＳ緩衝液）で１０分間メンブレンを洗浄し、ＥＣＬ Ａｄｖａｎｃｅ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ａｇｅｎｔ（ＧＥヘルスケア社製）を２％溶解した洗浄緩衝液中で１時間、室温で緩やかに振とうしてブロッキングを行った。その後、メンブレンを洗浄緩衝液で５分間の洗浄を２回行い、一次抗体反応としてＧＦＰ Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｔａｇ（Ａｆｆｉｎｉｔｙ ＢｉｏＲｅａｇｅｎｔｓ社製）をＣａｎ Ｇｅｔ Ｓｉｇｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｒｅａｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（東洋紡社製）で４，０００倍希釈した溶液中で、４０分間、室温でゆるやかに振とうした。次に、洗浄緩衝液で２分間の洗浄を１回、５分間の洗浄を２回、１５分間の洗浄を１回行い、二次抗体反応としてＥＣＬ 抗ウサギＩｇＧ（Ａｎｔｉ－ｒａｂｂｉｔ ＩｇＧ），西洋ワサビペルオキシダーゼ連結種特異的全抗体（Ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｓｐｅｃｉｅｓ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｗｈｏｌｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ）（ロバ（ｄｏｎｋｅｙ）由来）（ＧＥヘルスケア社製）とＳ－タンパク質－ＨＲＰ複合体（Ｓ－Ｐｒｏｔｅｉｎ－ＨＲＰ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）（ＧＥヘルスケア社製）とをＣａｎ Ｇｅｔ Ｓｉｇｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｒｅａｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（東洋紡社製）で５０，０００倍希釈した溶液中で、１時間、室温でゆるやかに振とうした。その後、洗浄緩衝液で５分間の洗浄を３回行い、ＥＣＬ Ａｄｖａｎｃｅ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＧＥヘルスケア社製）を用いて、化学発光検出装置ＣｈｅｍｉＤｏｃ ＸＲＳ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ 社製）及びゲルイメージ解析ソフトウェアＱｕａｎｔｉｔｙ Ｏｎｅ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社製）によりＧＦＰシグナルの検出を行い、シグナル強度を測定し

た。

【００３９】

ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ－ＧＦＰ、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－ＧＦＰ、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｍ－ＧＦＰ、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ａ－ＧＦＰの培地画分において、適正な分子量を有するＧＦＰのシグナルが検出され、ＧＦＰの分泌量は、培養液　１ｍＬ　当たり、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ－ＧＦＰでは２．４ｎｇ、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－ＧＦＰでは２０．７ｎｇ、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｍ－ＧＦＰでは１０．１ｎｇ、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ａ－ＧＦＰでは１．８ｎｇと算出され、植物細胞外に目的とする外来タンパク質が分泌されることが明らかとなった。また、分泌されたＧＦＰのうち、分解されなかったＧＦＰの割合を算出したところ、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ－ＧＦＰ導入細胞では１７％、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－ＧＦＰ導入細胞では６１％、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｍ－ＧＦＰ導入細胞では４９％、ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ａ－ＧＦＰ導入細胞では３８％であった。この結果から、ＧＹ１ＳＰを外来タンパク質に連結した場合、細胞外に所望の外来タンパク質が分泌されること、また、連結部位にアミノ酸を介在させた場合には、連結部位にアミノ酸を介在させなかった場合に比較して、分解されること無く得られる外来タンパク質の収率が高まり易いことが判明した。

【実施例３】

【００４０】

（グリシニン小胞体輸送シグナル配列（ＧＹ１ＳＰ）を有するリパーゼ発現プラスミドの構築）

【００４１】

酵母カンジダ・ルゴーサ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｒｕｇｏｓａ）由来リパーゼを植物で発現させるために、グリシニン小胞体輸送シグナル配列（ＧＹ１ＳＰ）をコードするＤＮＡとリパーゼをコードするＤＮＡとをコドンのフレームが変わることなく連結してなる発現プラスミドを構築した。

【００４２】

（１）セリン残基連結型リパーゼ分泌発現プラスミド（ｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙ）の構築

まず、リパーゼのアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｕｍｂｅｒ　Ｐ２０２６１）を元に、コドン使用頻度を植物でのタンパク質翻訳に適したものにした配列番号３７で示される塩基配列を全合成した。これをプラスミドｐＴＶ１１８Ｎ（タカラバイオ社製）の制限酵素ＢａｍＨＩ及びＨｉｎｄＩＩＩ切断部位に挿入して、リパーゼをコードするコドン改変塩基配列を有するプラスミドＳＹＮ２２４－７８を得た。

このプラスミドＳＹＮ２２４－７８を鋳型に、配列番号３８及び３９で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてＰＣＲを行い、末端に制限酵素ＮｈｅＩ及びＳａｃＩの認識配列をそれぞれ有するＤＮＡ断片を増幅した。ＰＣＲはＤＮＡポリメラーゼＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－（東洋紡社製）を用いて、９４℃で２分間の保温を行った後、９４℃で３０秒間、次いで５０℃で３０秒間、さらに６８℃で９０秒間の保温を１サイクルとしてこれを３０回繰り返し、最後に６８℃で３分間の保温を行った。ＤＮＡ断片精製キットＭａｇＥｘｔｒａｃｔｏｒ　－ＰＣＲ　＆　Ｇｅｌ　Ｃｌｅａｎ　ｕｐ－（東洋紡社製）を用いて増幅した断片を反応液から回収精製し、遺伝子クローニングキットＴａＫａＲａ　ＢＫＬ　Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）を用いてキット付属のプラスミドｐＵＣ１１８の制限酵素ＳｍａＩ切断部位にライゲーションした。これを大腸菌ＤＨ５α株のコンピテントセル（東洋紡社製）に導入してアンピシリン耐性株を選抜し、選抜耐性株のプラスミドの塩基配列を塩基配列解析用反応キットＢｉｇＤｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　ｖ３．１　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｋｉｔ（アプライドバイオシステムズ社製）及び塩基配列解析装置ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　３１００　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて解析した。正しい塩基配列を有するプラスミドを選抜し、このプラスミドを制限酵素ＮｈｅＩ及びＳａｃＩで消化してＮ－

末端側にセリン残基を有する１．６ｋｂｐのＤＮＡ断片を得た。このＤＮＡ断片をｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－ＧＦＰの制限酵素ＮｈｅＩ及びＳａｃＩ切断部位に置換挿入することにより、配列番号４０で示される塩基配列を有し、ＧＹ１ＳＰとリパーゼとがセリン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドｐＳＵＭ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙ（図５）を得た。

【００４３】

配列番号３７：5'-GGATCCATGGCTCCAACTGCAACTCTTGCTAACGGTGATACCATTACTGGACTTAACGCTATT
ATCAATGAGGCATTCCTCGGTATTCCTTTTGCTGAGCCACCTGTTGGTAACCTTAGATTCAAGGACCCAGTTCCTTACTC
CGGATCACTTGATGGTCAGAAGTTTACTTCTTACGGACCATCCTGCATGCAACAGAATCCAGAAGGTACCTATGAAGAGA
ACCTCCCAAAGGCTGCACTTGATCTTGTGATGCAGTCCAAAGTTTTCGAGGCTGTGTCTCCTTCATCCGAGGACTGTCTC
ACTATTAATGTTGTGAGGCCACCTGGAACCAAGGCTGGTGCAAACCTTCCAGTTATGCTTTGGATCTTTGGTGGAGGTTT
CGAGGTTGGTGGAACTTCAACTTTTCCTCCAGCTCAAATGATCACTAAGTCTATTGCTATGGGTAAACCAATCATTCATG
TTTCAGTGAATTACCGTGTGTCTTCATGGGGATTCCTCGCAGGTGATGAGATTAAGGCTGAAGGTTCAGCTAACGCTGGA
CTTAAAGACCAGAGACTTGGTATGCAATGGGTTGCAGATAATATTGCTGCTTTTGGAGGTGACCCTACCAAGGTGACTAT
CTTCGGAGAGTCCGCAGGTTCTATGTCTGTTATGTGTCACATTCTTTGGAACGATGGAGACAATACTTATAAGGGTAAAC
CACTCTTCAGAGCTGGAATTATGCAATCTGGTGCTATGGTGCCTTCAGACGCAGTTGATGGAATCTACGGTAACGAGATT
TTTGATCTTCTTGCTTCCAATGCTGGATGTGGTTCTGCATCCGATAAGCTCGCTTGCCTTAGGGGTGTGTCCTCAGACAC
ACTTGAAGATGCTACTAACAATACCCCAGGATTCCTCGCATATTCATCTCTTAGACTTTCATACCTTCCTAGGCCAGACG
GTGTTAACATTACAGATGACATGTATGCTCTTGTGAGAGAGGGTAAATATGCTAATATCCCTGTTATTATTGGAGATCAG
AACGACGAAGGTACTTTCTTCGGAACATCCTCACTCAATGTGACTACCGACGCTCAGGCAAGAGAGTACTTTAAGCAATC
TTTCGTTCATGCTTCAGATGCAGAAATTGACACTCTTATGACTGCTTATCCAGGTGATATTACTCAAGGCTCCCCTTTTG
ACACAGGCATTCTTAACGCTCTCACTCCACAATTCAAGAGGATTTCAGCAGTTCTTGGCGATCTTGGTTTTACCCTCGCT
AGACGTTATTTCCTTAATCATTACACTGGTGGAACAAAGTATTCTTTCCTTTCAAAACAGCTTTCCGGTCTCCCAGTGCT
TGGAACTTTCCACTCAAACGACATCGTTTTCCAGGATTATCTTCTCGGTTCCGGTTCTCTTATTTATAATAACGCTTTCA
TTGCATTCGCTACCGACCTTGATCCAAATACTGCTGGACTCCTTGTTAAGTGGCCTGAATACACATCCTCTTCCCAAAGT
GGTAACAACCTTATGATGATCAATGCTCTCGGTCTTTATACTGGTAAAGACAACTTCAGAACCGCAGGATACGATGCTCT
TTTCTCTAATCCTCCATCATTCTTCGTGTGAGAGCTC-3'

【００４４】

配列番号３８：5'-GCTAGCGCTCCAACTGCAACTCTTGCTAAC-3'

配列番号３９：5'-GAGCTCTCACACGAAGAATGATGGAGGATTAGAG-3'

【００４５】

配列番号４０：5'-GGATCCATGGCCAAGCTAGTTTTTTCCCTTTGTTTTCTGCTTTTCAGTGGCTGCTGCTTCGCT
AGCGCTCCAACTGCAACTCTTGCTAACGGTGATACCATTACTGGACTTAACGCTATTATCAATGAGGCATTCCTCGGTAT
TCCTTTTGCTGAGCCACCTGTTGGTAACCTTAGATTCAAGGACCCAGTTCCTTACTCCGGATCACTTGATGGTCAGAAGT
TTACTTCTTACGGACCATCCTGCATGCAACAGAATCCAGAAGGTACCTATGAAGAGAACCTCCCAAAGGCTGCACTTGAT
CTTGTGATGCAGTCCAAAGTTTTCGAGGCTGTGTCTCCTTCATCCGAGGACTGTCTCACTATTAATGTTGTGAGGCCACC
TGGAACCAAGGCTGGTGCAAACCTTCCAGTTATGCTTTGGATCTTTGGTGGAGGTTTCGAGGTTGGTGGAACTTCAACTT
TTCCTCCAGCTCAAATGATCACTAAGTCTATTGCTATGGGTAAACCAATCATTCATGTTTCAGTGAATTACCGTGTGTCT
TCATGGGGATTCCTCGCAGGTGATGAGATTAAGGCTGAAGGTTCAGCTAACGCTGGACTTAAAGACCAGAGACTTGGTAT
GCAATGGGTTGCAGATAATATTGCTGCTTTTGGAGGTGACCCTACCAAGGTGACTATCTTCGGAGAGTCCGCAGGTTCTA
TGTCTGTTATGTGTCACATTCTTTGGAACGATGGAGACAATACTTATAAGGGTAAACCACTCTTCAGAGCTGGAATTATG
CAATCTGGTGCTATGGTGCCTTCAGACGCAGTTGATGGAATCTACGGTAACGAGATTTTTGATCTTCTTGCTTCCAATGC
TGGATGTGGTTCTGCATCCGATAAGCTCGCTTGCCTTAGGGGTGTGTCCTCAGACACACTTGAAGATGCTACTAACAATA
CCCCAGGATTCCTCGCATATTCATCTCTTAGACTTTCATACCTTCCTAGGCCAGACGGTGTTAACATTACAGATGACATG
TATGCTCTTGTGAGAGAGGGTAAATATGCTAATATCCCTGTTATTATTGGAGATCAGAACGACGAAGGTACTTTCTTCGG
AACATCCTCACTCAATGTGACTACCGACGCTCAGGCAAGAGAGTACTTTAAGCAATCTTTCGTTCATGCTTCAGATGCAG
AAATTGACACTCTTATGACTGCTTATCCAGGTGATATTACTCAAGGCTCCCCTTTTGACACAGGCATTCTTAACGCTCTC
ACTCCACAATTCAAGAGGATTTCAGCAGTTCTTGGCGATCTTGGTTTTACCCTCGCTAGACGTTATTTCCTTAATCATTA
CACTGGTGGAACAAAGTATTCTTTCCTTTCAAAACAGCTTTCCGGTCTCCCAGTGCTTGGAACTTTCCACTCAAACGACA
TCGTTTTCCAGGATTATCTTCTCGGTTCCGGTTCTCTTATTTATAATAACGCTTTCATTGCATTCGCTACCGACCTTGAT

CCAAATACTGCTGGACTCCTTGTTAAGTGGCCTGAATACACATCCTCTTCCCAAAGTGGTAACAACCTTATGATGATCAA
TGCTCTCGGTCTTTATACTGGTAAAGACAACTTCAGAACCGCAGGATACGATGCTCTTTTCTCTAATCCTCCATCATTCT
TCGTGTGAGAGCTC-3'

【００４６】

（２）細胞質型リパーゼ発現プラスミドの構築

プラスミドＳＹＮ２２４－７８を制限酵素ＢａｍＨＩ及びＳａｃＩで消化して配列番号３７で示される塩基配列を有するＤＮＡ断片を回収精製し、このＤＮＡ断片を、制限酵素ＢａｍＨＩ及びＳａｃＩで消化したプラスミドｐＢＩ２２１にライゲーションすることにより、ＧＹ１ＳＰが連結されていないリパーゼを発現するプラスミドｐＳＵＭ－３５Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙ（図６）を得た。

【００４７】

（３）感染導入用リパーゼ発現バイナリーベクターの構築

前記（１）及び（２）のプラスミドを、それぞれ、制限酵素ＢａｍＨＩ及びＳａｃＩで消化し、リパーゼをコードする領域を含むＤＮＡ断片を得た。これらのＤＮＡ断片を、制限酵素ＢａｍＨＩ及びＳａｃＩで消化したｐＢＩ１２１にそれぞれライゲーションすることにより、ＧＹ１ＳＰとリパーゼとがセリン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するバイナリーベクタープラスミドｐＢＩ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙ（図７）、及び、ＧＹ１ＳＰが連結されていないリパーゼを発現するバイナリーベクタープラスミドｐＢＩ－３５Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙ（図８）を得た。

【００４８】

（４）ウサギ抗リパーゼ抗血清の作製

プラスミドＳＹＮ２２４－７８を制限酵素ＢａｍＨＩ及びＨｉｎｄＩＩＩで消化してリパーゼをコードする１．６ｋｂｐのＤＮＡ断片を得た。このＤＮＡ断片をプラスミドｐＱＥ－８０Ｌ（ＱＩＡＧＥＮ社製）の制限酵素ＢａｍＨＩ及びＨｉｎｄＩＩＩ切断部位に挿入し、Ｎ－末端側にヒスチジンタグペプチドが付加されたリパーゼ発現プラスミドを得た。この発現プラスミドを大腸菌ＪＭ１０９株に導入し、ヒスチジンタグペプチド付加リパーゼタンパク質を精製した。このタンパク質を抗原としてウサギに免疫し、抗リパーゼ抗体を含む抗血清（旭日テクノグラス社製）を得た。

【実施例４】

【００４９】

（組換えタバコにおけるリパーゼの発現解析）

（１）タバコへのリパーゼ発現ベクターの導入および組換えタバコの選抜

実施例３（３）で作製したリパーゼ発現バイナリーベクターをアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）感染法によりそれぞれタバコに導入した。感染導入は内宮（植物遺伝子操作マニュアル、トランスジェニック植物の作り方、講談社サイエンティフィク、１９９０年、ＩＳＢＮ４－０６－１５３５１３－７）の方法に従った。

リパーゼ発現バイナリーベクターを、それぞれ、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）　ＬＢＡ４４０４（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）に導入し、３００ｍｇ／Ｌストレプトマイシン、１００ｍｇ／Ｌ　リファンピシン及び２５ｍｇ／Ｌカナマイシンを含むＬＢ液体培地で２８℃、終夜培養した培養液を調整した。無菌培養したタバコ（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ　ｔａｂａｃｕｍ　ｓｔｒａｉｎ　ＳＲ－１）から採取した葉片をこの培養液に浸漬し、０．１ｍｇ／Ｌ　ナフタレン酢酸（ＮＡＡ）及び１．０ｍｇ／Ｌベンジルアデニン（ＢＡ）を添加したＭＳ寒天培地（ＭＳ無機塩類、ＭＳビタミン類、３％ショ糖、０．８％寒天）に植え込み、蛍光照明下、２３～２５℃、２日間培養した。次に、培養葉片を滅菌水で洗浄し、０．１ｍｇ／Ｌ　ＮＡＡ、１．０ｍｇ／Ｌ　ＢＡ、５００ｍｇ／Ｌ　セフォタキシムを添加したＭＳ寒天培地で７日間培養してＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍの除菌を行った。次いで、培養葉片を０．１ｍｇ／Ｌ　ＮＡＡ、１．０ｍｇ／Ｌ　ＢＡ、５００ｍｇ／Ｌ　セフォタキシム、１００ｍｇ／Ｌカナマイシンを添加したＭＳ寒天培地に移し、２週間毎に同一組成の培地に移し変えながら、２ヶ月間培養して不定芽を誘導した。

不定芽を採取して１００ｍｇ／Ｌカナマイシンを添加したＭＳ寒天培地に移して発根させ幼苗とし、再生個体を培土に移して人工気象室内で馴化後、温室で育成して採種した。

【００５０】

（２）ウエスタンブロット法による組換えタバコのリパーゼ発現検定

前述のようにして得た組換えタバコの葉で発現しているリパーゼをウエスタンブロット法及び免疫染色法を用いて検出した。

まず、ジルコニアビーズ（５ｍｍφ、ＹＴＺボール）（ニッカトー社製）を１個入れたサンプリングチューブに組換えタバコの葉片２ｃｍ角程度を入れて液体窒素で急速冷凍し、ミキサーミルＭＭ－３００（ＱＩＡＧＥＮ社製）で破砕した。破砕物にＰＢＳ緩衝液３００μＬを添加、混合した後、１５，０００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心して上清を回収し、当該上清を再度４℃で５分間遠心して上清を得た。実施例２（２）の方法に従ってタンパク質濃度測定を行い、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロット、免疫染色により、リパーゼタンパク質の検出を行った。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルとしてＰＡＧミニ「第一」（第一化学薬品社製）を用いた。タンパク質転写後のメンブレンの抗体反応では、一次抗体として実施例３（５）のウサギ抗血清を、二次抗体としてｇｏａｔ　ａｎｔｉ－ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ－ＡＰ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社製）を用いた。抗体反応後のメンブレンをＡＰ発色キット（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社製）により発色させ、リパーゼタンパク質を検出した。

上記のウエスタンブロット法による検定の結果、ｐＢＩ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入した組換えタバコ２２個体のうち１５個体で、ｐＢＩ－３５Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入した組換えタバコ９８個体のうち１６個体で、相対的に高い量のリパーゼ発現が確認された。これらの個体から得たＴ１種子を５０ｍｇ／Ｌのカナマイシンを含む改変ＭＳ寒天培地に無菌播種してカナマイシン耐性を示す個体を選抜し、選抜された耐性個体を育成してＴ２種子を得た。Ｔ２種子を再度カナマイシン添加培地に無菌播種し、カナマイシン感受性個体の現れない系統をリパーゼ発現固定系統として選抜した。

【００５１】

（３）リアルタイムＰＣＲによるリパーゼ遺伝子の転写量解析

選抜したＴ２固定系統の種子を播種し、馴化１２日後の葉片を２ｃｍ角程度サンプリングした。葉片から植物ＲＮＡ抽出キットＲＮｅａｓｙ　Ｐｌａｎｔ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を用いて全ＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡ合成キットＲｅｖｅｒＴｒａ　Ａｃｅ（東洋紡社製）を用いてｃＤＮＡを合成した。合成したｃＤＮＡを鋳型に、配列番号４１及び４２で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして、リアルタイムＰＣＲ装置７５００　Ｆａｓｔ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてリパーゼのｍＲＮＡ定量を行った。内部標準として、配列番号４３および４４に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして、タバコユビキチン遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｕｍｂｅｒ　Ｕ６６２６４）のｍＲＮＡ量を測定した。

その結果、ｐＢＩ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙ、及びｐＢＩ－３５Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入したそれぞれの選抜Ｔ２固定系統において、同程度のリパーゼ遺伝子転写レベルを示す個体が得られた（図９）。

【００５２】

配列番号４１：5'-TTGATCTTCTTGCTTCCAATGC-3'

配列番号４２：5'-GTCTGAGGACACACCCCTAAGG-3'

配列番号４３：5'-GAAGCAGCTCGAGGATGGAA-3'

配列番号４４：5'-GACGGGTTGACTCTTTCTGGAT-3'

【００５３】

（４）組換えタバコにおけるリパーゼタンパク質の発現量解析

リパーゼ遺伝子の転写レベルが同程度の組換えタバコ個体の葉片から、全細胞画分、及び、Ｂｏｅｒｎｋｅ　ｅｔ　ａｌ（２００２、Ｐｌａｎｔａ　２１４、ｐｐ３５６－３６４）の方法に従って細胞外アポプラスト画分及び細胞残渣画分を分画し、それぞれの画分

中のリパーゼタンパク質をウエスタンブロット法及び免疫染色法を用いて定量し、リパーゼタンパク質の分泌量を算出した。

馴化１７日後の各個体から０．１～０．２ｇの葉片を採取し、前記（２）の方法に従ってタンパク質を抽出し、これを全細胞画分とした。

また、同様に馴化１７日後の各個体から５～９ｇの葉を採取して中肋及び主葉脈を除去した後、１～２ｃｍ角の葉片にし、１００ｍＬの１Ｍ　ＫＣｌ溶液に浸漬して５分間の減圧処理を行った。この葉片を１，０００ｇ、４℃、３分間遠心して上清を回収し、細胞外アポプラスト溶液とした。溶液をさらに遠心式フィルターユニットＣｅｎｔｒｉｐｒｅｐ　ＹＭ－１０（ミリポア社製）及びＭｉｃｒｏｃｏｎ　ＹＭ－１０を用いて液量が１／２０程度になるまで濃縮し、これを細胞外アポプラスト画分とした。

さらに、細胞外アポプラスト溶液回収後の遠心沈殿残渣の一部を採取し、前記（２）の方法に従ってタンパク質を抽出し、細胞残渣画分とした。これらの画分について、実施例２（２）の方法に従って、タンパク質濃度測定及びＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロットを行った。免疫染色法の検出試薬としてＥＣＬ　Ｐｌｕｓ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（ＧＥヘルスケア社製）、ブロッキング液はスキムミルクを５％溶解した洗浄緩衝液を用いた。一次抗体反応には実施例３（５）のウサギ抗リパーゼ抗血清をＣａｎ　Ｇｅｔ　Ｓｉｇｎａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｅｎｈａｎｃｅｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（東洋紡社製）で１０，０００倍希釈した溶液を、二次抗体反応にはＥＣＬ　Ａｎｔｉ－ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ，　Ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ－Ｌｉｎｋｅｄ　Ｓｐｅｃｉｅｓ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｗｈｏｌｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ｆｒｏｍ　ｄｏｎｋｅｙ）（ＧＥヘルスケア社製）とＳ－ｐｒｏｔｅｉｎ－ＨＲＰ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（ＧＥヘルスケア社製）をＣａｎ　Ｇｅｔ　Ｓｉｇｎａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｅｎｈａｎｃｅｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（東洋紡社製）でそれぞれ１０，０００倍、３０，０００倍希釈した溶液を用いた。スタンダードとしてリパーゼＯＦ（名糖産業社製）を用いた。

その結果、プラスミドｐＢＩ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入した組換えタバコでリパーゼタンパク質のシグナルが検出された（図１０）。分画をした結果、細胞外アポプラスト画分にリパーゼシグナルが検出され、リパーゼタンパク質が分泌されていることを確認した（図１１）。スタンダードの泳動量とそのシグナル強度を基に、リパーゼの生産量および分泌量を算出した結果、葉生重量１ｇ当たり２８．９μｇのリパーゼタンパク質を蓄積し、そのうち細胞外アポプラストに１．７６μｇのリパーゼを分泌していることが分かった。

【００５４】

（５）組換えタバコ細胞画分中のリパーゼの酵素活性測定

リパーゼタンパク質が検出された画分について、酵素活性測定試薬リパーゼキットＳ（大日本住友製薬社製）を用いて活性測定を行った。スタンダードとしてリパーゼＯＦ（名糖産業社製）を利用した。

その結果、プラスミドｐＢＩ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入した組換えタバコの全細胞画分は総タンパク質１ｇ当たり５．７ＩＵ、細胞外アポプラスト画分は総タンパク質１ｇ当たり３７．３ＩＵの活性を有していることが分かった。以上の結果からプラスミドｐＢＩ－３５Ｓ－ＧＹ１ＳＰ　Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入した組換えタバコは酵素活性を有するリパーゼを生産し、細胞外アポプラスト領域に分泌することが示された。

また、細胞外アポプラスト領域に分泌されたリパーゼは、活性が高く、正確にフォールディング、およびプロセシングされていることが推測される。

【００５５】

実施例５（グリシニン遺伝子プロモーター及びターミネーターを有するリパーゼ分泌発現プラスミドの構築）

酵母カンジダ・ルゴーサ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｒｕｇｏｓａ）由来リパーゼを植物種子で発現させるために、グリシニン遺伝子プロモーター及びターミネーターが機能可能なかた

ちで目的とするタンパク質をコードするＤＮＡと連結された種子特異的発現プラスミドを構築した。

日本特許第３７１１５６４号に記載のプラスミドｐＳＵＭ－ＧＹ１を鋳型に、配列番号４５で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号４６で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてＰＣＲを行い、３’－末端に制限酵素ＢａｍＨＩの認識配列を有するグリシニン遺伝子プロモーター断片を増幅した。当該ＰＣＲはＤＮＡポリメラーゼＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（東洋紡社製）を用いて、９４℃で２分間の保温を行った後、９４℃で３０秒間、次いで４０℃で３０秒間、さらに６８℃で２分間の保温を１サイクルとしてこれを２５回繰り返し、最後に６８℃で３分間の保温を行った。得られた増幅ＤＮＡ断片をプラスミドｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ（インビトロジェン社製）のＰＣＲ産物挿入部位にライゲーションした。

同様にして、配列番号４７で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号４８で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてＰＣＲを行い、両末端に制限酵素ＳａｃＩの認識配列及びＨｉｎｄＩＩＩの認識配列をそれぞれ有するグリシニン遺伝子ターミネーター断片を増幅した。このＤＮＡ増幅断片を、グリシニン遺伝子プロモーター断片を挿入したプラスミドの制限酵素ＳａｃＩ及びＨｉｎｄＩＩＩ部位にライゲーションした。

さらに、配列番号４９及び５０で示される塩基配列をそれぞれ有し末端がリン酸化された合成オリゴヌクレオチドを等モル混合して６５℃で５分間加熱した後に徐冷してリンカーを調製し、得られたリンカーをグリシニン遺伝子プロモーター断片及びターミネーター断片を挿入したプラスミドの制限酵素ＢａｍＨＩ部位とＳａｃＩ部位との間に挿入した。このプラスミドを制限酵素ＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄＩＩＩで消化してプラスミドｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）に挿入した。

これを大腸菌ＤＨ５α株のコンピテントセル（東洋紡社製）に導入してアンピシリン耐性株を選抜し、選抜された耐性株のプラスミドの塩基配列を塩基配列解析用反応キットＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ ｖ３．１ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｋｉｔ及び塩基配列解析装置ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ ３１００ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｎａｌｙｚｅｒ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて解析し、グリシニン遺伝子プロモーター及びターミネーターを有するプラスミドを得た。

実施例１（１）で調製されたグリシニン小胞体輸送シグナル配列を有するリンカーと、実施例３（１）で調製されたリパーゼのアミノ末端にセリン残基が付加されたポリペプチドをコードする１．６ｋｐｂのＤＮＡ断片とを、グリシニン遺伝子プロモーター及びターミネーターを有するプラスミドの制限酵素ＢａｍＨＩ部位とＳａｃＩ部位との間に挿入した。このようにして、配列番号５１で示される塩基配列を有し、グリシニン遺伝子プロモーター及びターミネーターを有し、かつＧＹ１ＳＰとリパーゼとがセリン残基を介して連結された融合タンパク質を発現するプラスミドｐＳＵＭ－ＧＹ１－ＧＹ１ＳＰ Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙ（図－１２）を得た。

【００５６】

配列番号４５：5'-gttttcccagtcacgac-3’

配列番号４６：5'-ggatccGACTGATGAGTGTTTAAGGACCAATG-3’

配列番号４７：5'-gagctcAACCAATAAATAATAATAATAATAATG-3’

配列番号４８：5'-aagcttCAAGTCATGAAGAACCTGATAAGACGTC-3’

配列番号４９：5'-gatccgcggccgcgagct-3’

配列番号５０：5'-cgcggccgcg-3’

配列番号５１：5'-gaattcTCTCTTATAAAACACAAACACAATTTTTAGATTTTATTTAAATAATCATCAATCG
ATTATAATTATTTATATATTTTTCTATTTTCAAAGAAGTAAATCATGAGCTTTTCCAACTCAACATCTATTTTTTTTCTC
TCAACCTTTTTCACATCTTAAGTAGTCTCACCCTTTATATATATAACTTATTTCTTACCTTTTACATTATGTAACTTTTA
TCACCAAAACCAACAACTTTAAAATTTTATTAAATAGACTCCACAAGTAACTTGACACTCTTACATTCATCGACATTAAC
TTTTATCTGTTTTATAAATATTATTGTGATATAATTTAATCAAAATAACCACAAACTTTCATAAAAGGTTCTTATTAAGC
ATGGCATTTAATAAGCAAAAACAACTCAATCACTTTCATATAGGAGGTAGCCTAAGTACGTACTCAAAATGCCAACAAAT

AAAAAAAAAGTTGCTTTAATAATGCCAAAACAAATTAATAAAACACTTACAACACCGGATTTTTTTTAATTAAAATGTGC
CATTTAGGATAAATAGTTAATATTTTTAATAATTATTTAAAAAGCCGTATCTACTAAAATGATTTTTATTTGGTTGAAAA
TATTAATATGTTTAAATCAACACAATCTATCAAAATTAAACTAAAAAAAAAATAAGTGTACGTGGTTAACATTAGTACAG
TAATATAAGAGGAAAATGAGAAATTAAGAAATTGAAAGCGAGTCTAATTTTTAAATTATGAACCTGCATATATAAAAGGA
AAGAAAGAATCCAGGAAGAAAAGAAATGAAACCATGCATGGTCCCCTCGTCATCACGAGTTTCTGCCATTTGCAATAGAA
ACACTGAAACACCTTTCTCTTTGTCACTTAATTGAGATGCCGAAGCCACCTCACACCATGAACTTCATGAGGTGTAGCAC
CCAAGGCTTCCATAGCCATGCATACTGAAGAATGTCTCAAGCTCAGCACCCTACTTCTGTGACGTGTCCCTCATTCACCT
TCCTCTCTTCCCTATAAATAACCACGCCTCAGGTTCTCCGCTTCACAACTCAAACATTCTCTCCATTGGTCCTTAAACAC
TCATCAGTCggatccATGGCCAAGCTAGTTTTTTCCCTTTGTTTTCTGCTTTTCAGTGGCTGCTGCTTCGCTAGCGCTCC
AACTGCAACTCTTGCTAACGGTGATACCATTACTGGACTTAACGCTATTATCAATGAGGCATTCCTCGGTATTCCTTTTG
CTGAGCCACCTGTTGGTAACCTTAGATTCAAGGACCCAGTTCCTTACTCCGGATCACTTGATGGTCAGAAGTTTACTTCT
TACGGACCATCCTGCATGCAACAGAATCCAGAAGGTACCTATGAAGAGAACCTCCCAAAGGCTGCACTTGATCTTGTGAT
GCAGTCCAAAGTTTTCGAGGCTGTGTCTCCTTCATCCGAGGACTGTCTCACTATTAATGTTGTGAGGCCACCTGGAACCA
AGGCTGGTGCAAACCTTCCAGTTATGCTTTGGATCTTTGGTGGAGGTTTCGAGGTTGGTGGAACTTCAACTTTTCCTCCA
GCTCAAATGATCACTAAGTCTATTGCTATGGGTAAACCAATCATTCATGTTTCAGTGAATTACCGTGTGTCTTCATGGGG
ATTCCTCGCAGGTGATGAGATTAAGGCTGAAGGTTCAGCTAACGCTGGACTTAAAGACCAGAGACTTGGTATGCAATGGG
TTGCAGATAATATTGCTGCTTTTGGAGGTGACCCTACCAAGGTGACTATCTTCGGAGAGTCCGCAGGTTCTATGTCTGTT
ATGTGTCACATTCTTTGGAACGATGGAGACAATACTTATAAGGGTAAACCACTCTTCAGAGCTGGAATTATGCAATCTGG
TGCTATGGTGCCTTCAGACGCAGTTGATGGAATCTACGGTAACGAGATTTTTGATCTTCTTGCTTCCAATGCTGGATGTG
GTTCTGCATCCGATAAGCTCGCTTGCCTTAGGGGTGTGTCCTCAGACACACTTGAAGATGCTACTAACAATACCCCAGGA
TTCCTCGCATATTCATCTCTTAGACTTTCATACCTTCCTAGGCCAGACGGTGTTAACATTACAGATGACATGTATGCTCT
TGTGAGAGAGGGTAAATATGCTAATATCCCTGTTATTATTGGAGATCAGAACGACGAAGGTACTTTCTTCGGAACATCCT
CACTCAATGTGACTACCGACGCTCAGGCAAGAGAGTACTTTAAGCAATCTTTCGTTCATGCTTCAGATGCAGAAATTGAC
ACTCTTATGACTGCTTATCCAGGTGATATTACTCAAGGCTCCCCTTTTGACACAGGCATTCTTAACGCTCTCACTCCACA
ATTCAAGAGGATTTCAGCAGTTCTTGGCGATCTTGGTTTTACCCTCGCTAGACGTTATTTCCTTAATCATTACACTGGTG
GAACAAAGTATTCTTTCCTTTCAAAACAGCTTTCCGGTCTCCCAGTGCTTGGAACTTTCCACTCAAACGACATCGTTTTC
CAGGATTATCTTCTCGGTTCCGGTTCTCTTATTTATAATAACGCTTTCATTGCATTCGCTACCGACCTTGATCCAAATAC
TGCTGGACTCCTTGTTAAGTGGCCTGAATACACATCCTCTTCCCAAAGTGGTAACAACCTTATGATGATCAATGCTCTCG
GTCTTTATACTGGTAAAGACAACTTCAGAACCGCAGGATACGATGCTCTTTTCTCTAATCCTCCATCATTCTTCGTGTGA
gagctcAACCAATAAATAATAATAATAATAATGAATAAGAAAACAAAGGCTTTAGCTTGCCTTTTGTTCACTGTAAAATA
ATAATGTAAGTACTCTCTATAATGAGTCACGAAACTTTTGCGGGAATAAAAGGAGAAATTCCAATGAGTTTTCTGTCAAA
TCTTCTTTTGTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTTTTTTTCTTTCTTCTGAGCTTCTTGCAAAACAAAAGGCAAACAATAACGA
TTGGTCCAATGATAGTTAGCTTGATCGATGATATCTTTAGGAAGTGTTGGCAGGACAGGACATGATGTAGAAGACTAAAA
TTGAAAGTATTGCAGACCCAATAGTTGAAGATTAACTTTAAGAATGAAGACGTCTTATCAGGTTCTTCATGACTTG-3’

【００５７】

実施例６（組換えダイズ種子におけるリパーゼの発現解析）

（１）ダイズへのリパーゼ発現ベクターの導入及び組換えダイズの選抜

実施例３（１）及び実施例５で作製されたリパーゼ発現プラスミドをそれぞれパーティクルガン法によりダイズ球状型不定胚に導入し、選抜した球状型不定胚へのリパーゼ遺伝子の導入をＰＣＲ法によって確認した。

滅菌したダイズ未熟種子より摘出した未熟胚の胚軸部を切除し、２枚の未熟子葉に分けて、誘導培地（ＭＳ無機塩類、Ｂ５培地ビタミン類（Ｇａｍｂｏｒｇ　ｅｔ　ａｌ，Ｅｘｐ．　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．（１９６８）Ｖｏｌ．５０，　ｐｐ１５１－１５８）、１８０μＭ　２，４－Ｄ、３％ショ糖、０．２％ゲルライト、ｐＨ７．０）に置床し、明期２３時間、暗期１時間、２３～２５℃で約１ヶ月間培養した。形成された球状型不定胚を増殖培地（ＭＳ無機塩類、Ｂ５培地ビタミン類、９０μＭ　２，４－Ｄ、３％ショ糖、０．２％ゲルライト、ｐＨ５．８）に移植し、２～３週間毎に同一組成の新鮮培地に移し換えながら、同一条件で５～８回培養した。

新しい増殖培地で３～４日間培養した球状型不定胚に、実施例３（１）または実施例５で作製されたリパーゼ発現プラスミドと、日本特許公開公報・特開２０００－８３６７９

号に記載のプラスミドｐＧ８ＣＲＧ１－２のプロモーター下流に大腸菌由来ＡＰＨ４をコードするＤＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ ｎｕｍｂｅｒ：Ｖ０１４９９）を連結したプラスミドとを等量混合し、遺伝子導入装置ＰＤＳ－１０００／Ｈｅシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ社製）を用いて導入した。導入操作の３～４日後に、０．２％ゲルライトで固化した選抜培地（ＭＳ無機塩類、Ｂ５培地ビタミン類、３０μＭ ハイグロマイシン、９０μＭ ２，４－Ｄ、３％ショ糖、ｐＨ５．８）または液体選抜培地に移し、明期２３時間、暗期１時間、２３～２５℃で培養した。２～３週間毎に同一組成の新鮮培地に移し変えながら、同一条件で５～８回培養した。なお、液体選抜培地の場合は、１００ｒｐｍで旋回培養した。

選抜した球状型不定胚をサンプリングし、核酸抽出試薬 ＰｒｅｐＭａｎ Ｕｌｔｒａ Ｒｅａｇｅｎｔ（アプライドバイオシステムズ社製）を４０μＬ添加して１００℃で１０分間加熱した。放冷後、１５，０００ｒｐｍ、２２℃、１分間遠心して上清を回収し、ゲノムＤＮＡ溶液とした。抽出したＤＮＡ溶液を鋳型に、配列番号５２で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号５３で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとしてＰＣＲを行い、リパーゼ遺伝子が導入された球状型不定胚を選抜した。ＰＣＲはＤＮＡポリメラーゼＴａＫａＲａ Ｅｘ Ｔａｑ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ Ｖｅｒｓｉｏｎ（タカラバイオ社製）を用いて、９４℃で２分間の保温を行った後、９４℃で３０秒間、次いで５５℃で３０秒間、さらに７２℃で１分間の保温を１サイクルとしてこれを３０回繰り返し、最後に７２℃で２分間の保温を行った。

【００５８】

配列番号５２：5'-ctggtgcaaaccttccagtt-3’

配列番号５３：5'-ttatcggatgcagaaccaca-3’

【００５９】

選抜した組換え球状型不定胚を発生培地（ＭＳ無機塩類、Ｂ５培地ビタミン類、６％マルトース、１％寒天、ｐＨ５．８）に移して６～８週間培養した後、１～２週間乾燥させた。白～黄色の子葉型胚となった不定胚を発芽培地（ＭＳ無機塩類、Ｂ５培地ビタミン類、３％ショ糖、０．２％ゲルライト、ｐＨ５．８）に移して２週間培養した。本葉が展開し、発根した再生個体を培土に移して人工気象室内で馴化後、温室で育成して採種した。

【００６０】

（２）ウエスタンブロット法による組換えダイズ種子のリパーゼタンパク質の発現量解析

組換えダイズ種子からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法及び免疫染色法を用いて定量し、リパーゼタンパク質の生産量を算出した。

一晩吸水させた組換えダイズ種子を４分割し、それぞれをジルコニアビーズ（５ｍｍφ、ＹＴＺボール）（ニッカトー社製）を１個いれたチューブに入れて液体窒素で急速冷凍した。冷凍した種子をミキサーミルＭＭ－３００（ＱＩＡＧＥＮ社製）で破砕し、ＰＢＳ緩衝液を３００μＬずつ添加してミキサーミルで混合し、１５，０００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離して上清を回収し、得られた上清を再度１５，０００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離して上清を得た。実施例２（２）の方法に従ってタンパク質濃度測定を行い、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロット、免疫染色を行った。一次抗体反応には実施例３（５）のウサギ抗リパーゼ抗血清をＣａｎ Ｇｅｔ Ｓｉｇｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｒｅａｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（東洋紡社製）で５０，０００倍希釈した溶液を、二次抗体反応にはＥＣＬ 抗ウサギＩｇＧ（Ａｎｔｉ－ｒａｂｂｉｔ ＩｇＧ），西洋ワサビペルオキシダーゼ連結種特異的全抗体（Ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｓｐｅｃｉｅｓ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｗｈｏｌｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ）（ロバ（ｄｏｎｋｅｙ）由来）（ＧＥヘルスケア社製）とＳ－タンパク質－ＨＲＰ複合体（Ｓ－ｐｒｏｔｅｉｎ－ＨＲＰ ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）（ＧＥヘルスケア社製）とをＣａｎ Ｇｅｔ Ｉｍｍｕｎｏｒｅａｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（東洋紡社製）でそれぞれ５０，０００倍希釈した溶液を用いた。スタンダードとしてリパーゼＯＦ（名糖産業社製）を用いた。

その結果、プラスミドｐＳＵＭ－ＧＹ１－ＧＹ１ＳＰ Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入した

組換えダイズ種子でリパーゼタンパク質のシグナルが検出された（図１３）。スタンダードの泳動量とそのシグナル強度を基に、リパーゼの生産量を算出した結果、可溶性タンパク質の約０．５％相当量のリパーゼタンパク質を生産していることが分かった。

【００６１】

（３）組換えダイズ種子中のリパーゼのＮ－末端アミノ酸配列解析

リパーゼタンパク質のシグナルが検出された組換えダイズ種子のタンパク質抽出液に、３０％となるように硫安を添加して、混合し、１５，０００ｒｐｍ、４℃、２０分間遠心分離を行った。得られた沈殿にＰＢＳ緩衝液を添加して、混合し、実施例２（２）に記載の方法でタンパク質濃度測定及びウエスタンブロット分析を行った。タンパク質を転写したメンブレンを染色液（０．１％ＣＢＢ、５０％メタノール、１０％酢酸）で１０分間振とうした後、脱色液（５０％メタノール、１０％酢酸）で２回脱色し、洗浄液で２回洗浄した。約６０ｋＤａに検出されたバンドを切り出し、アミノ末端アミノ酸配列解析に供した。

その結果、配列番号５４に示す、セリン残基とそれに続くリパーゼのアミノ酸配列が検出され、発現させた融合タンパク質がグリシニン小胞体輸送シグナル配列の直後でプロセシングを受けていることが示された。

【００６２】

配列番号５４：SAPTA

【００６３】

（４）組換えダイズ種子のタンパク質抽出液中のリパーゼの酵素活性測定

リパーゼタンパク質が検出された組換えダイズ種子のタンパク質抽出液について、活性測定を行った。基質４－Ｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌ ｄｅｃａｎｏａｔｅ（シグマ社製）をＤＭＳＯで溶解した後、０．５％トリトン Ｘ－１００（ナカライ社製）含有５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ６．５０）で２．５ｍＭに希釈した溶液を基質溶液として用いた。プラスミドｐＳＵＭ－ＧＹ１－ＧＹ１ＳＰ Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙ導入組換えダイズ種子のタンパク質抽出液３０μＬと２．５ｍＭ基質溶液３７０μＬとを混合し、３０℃、１０分間反応を行った。反応停止液としてアセトン８００μＬを添加、混合した。１５，０００ｒｐｍ、２２℃、１分間遠心を行い、上清１ｍＬの吸光度を４１０ｎｍで測定した。スタンダードとして４－Ｎｉｔｒｏｐｈｅｎｏｌ（Ｆｌｕｋａ社製）を用いた。なお、基質の加水分解物である４－Ｎｉｔｒｏｐｈｅｎｏｌを１分間に１μｍｏｌ生成する酵素量を１Ｕと定義する。

その結果、プラスミドｐＳＵＭ－ＧＹ１－ＧＹ１ＳＰ Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入した組換えダイズ種子では、乾燥種子重量１ｇ当たり１７．８Ｕのリパーゼ活性を有していることが分かった。以上の結果からプラスミドｐＳＵＭ－ＧＹ１－ＧＹ１ＳＰ Ｓ－Ｌｉｐ１ｓｏｙを導入した組換えダイズ種子では酵素活性を有するリパーゼを生産することが示された。

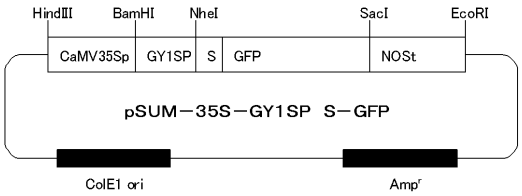
【配列表フリーテキスト】

【００６４】

配列番号６：合成ＤＮＡ
配列番号７：プライマー
配列番号８：プライマー
配列番号９：合成オリゴヌクレオチド
配列番号１０：合成オリゴヌクレオチド
配列番号１１：融合タンパク質発現用プラスミドが有する塩基配列
配列番号１２：フォワードプライマー
配列番号１３：改変リバースプライマー
配列番号１４：改変リバースプライマー
配列番号１５：改変リバースプライマー
配列番号１６：リバースプライマー
配列番号１７：改変リバースプライマー

配列番号１８：改変リバースプライマー
配列番号１９：改変リバースプライマー
配列番号２０：改変リバースプライマー
配列番号２１：改変リバースプライマー
配列番号２２：改変リバースプライマー
配列番号２３：改変リバースプライマー
配列番号２４：改変リバースプライマー
配列番号２５：改変リバースプライマー
配列番号２６：改変リバースプライマー
配列番号２７：改変リバースプライマー
配列番号２８：改変リバースプライマー
配列番号２９：改変リバースプライマー
配列番号３０：改変リバースプライマー
配列番号３１：改変リバースプライマー
配列番号３２：改変リバースプライマー
配列番号３３：改変リバースプライマー
配列番号３４：改変リバースプライマー
配列番号３５：改変リバースプライマー
配列番号３６：改変リバースプライマー
配列番号３７：合成ＤＮＡ
配列番号３８：プライマー
配列番号３９：プライマー
配列番号４０：融合タンパク質発現用プラスミドが有する塩基配列
配列番号４１：プライマー
配列番号４２：プライマー
配列番号４３：プライマー
配列番号４４：プライマー
配列番号４５：プライマー
配列番号４６：プライマー
配列番号４７：プライマー
配列番号４８：プライマー
配列番号４９：プライマー
配列番号５０：プライマー
配列番号５１：融合タンパク質発現用プラスミドが有する塩基配列
配列番号５２：プライマー
配列番号５３：プライマー

【図１】



【図２】



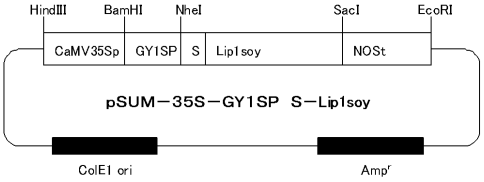
【図３】



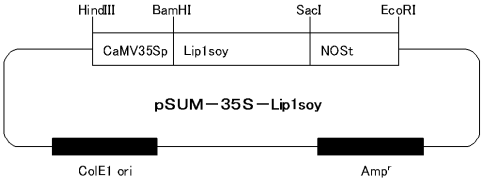
【図４】



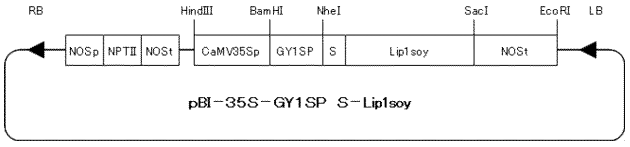
【図５】



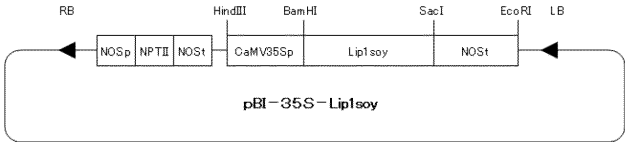
【図６】



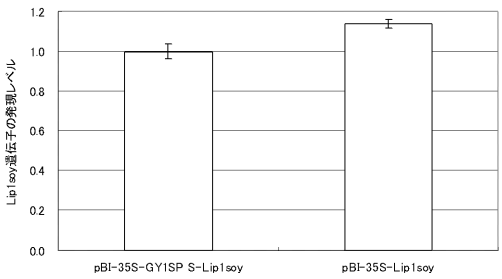
【図７】



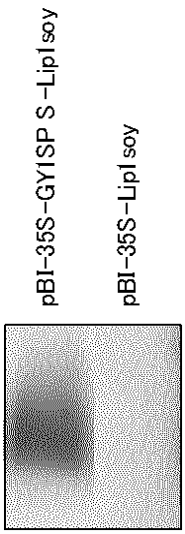
【図８】



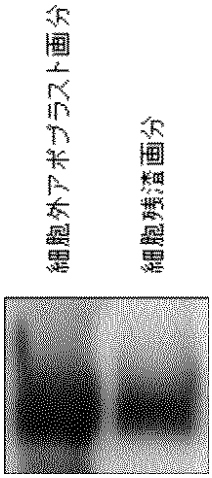
【図９】



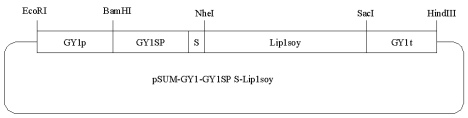
【図１０】



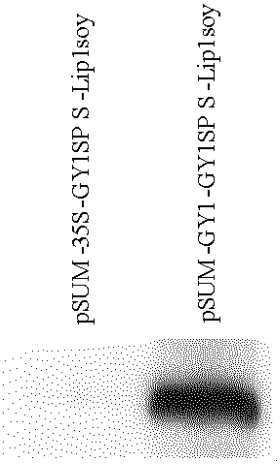
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【配列表】

2010041997000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ０１Ｈ　5/10	*(2006.01)*	Ａ０１Ｈ	5/10	

Ｆターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA16 CA17 CB02 CD14 CD17
4B024 AA08 AA20 BA80 CA04 DA01 EA04 FA17 GA11 GA17
4B064 AG01 CA11 CA19 CC24 DA11
4B065 AA73Y AA88X AA89X AA90Y AB01 AC15 BA02 BA12 CA53