

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6599354号
(P6599354)

(45) 発行日 令和1年10月30日(2019.10.30)

(24) 登録日 令和1年10月11日(2019.10.11)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z N A Z
C 1 2 N 15/67 (2006.01)	C 1 2 N 15/67 Z
C 1 2 N 15/82 (2006.01)	C 1 2 N 15/82 Z
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00 A

請求項の数 21 (全 60 頁)

(21) 出願番号	特願2016-558734 (P2016-558734)	(73) 特許権者	502121395
(86) (22) 出願日	平成27年3月27日(2015.3.27)		メディカゴ インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-513467 (P2017-513467A)		カナダ国 ジー1ブイ 3ブイ9、ケベック、ケベック、ルート ド レグリース
(43) 公表日	平成29年6月1日(2017.6.1)		1 O 2 O, スイート 6 O O
(86) 国際出願番号	PCT/CA2015/050240	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02015/143567		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成27年10月1日(2015.10.1)	(74) 代理人	100084146
審査請求日	平成30年3月20日(2018.3.20)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	61/971, 274	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成26年3月27日(2014.3.27)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(72) 発明者	マルクーアンドレ・ダウスト
(31) 優先権主張番号	PCT/CA2014/050326		カナダ、ジー1エックス・4エヌ4、ケベック、ケベック、リュ・ルイーズ・フィゼ
(32) 優先日	平成26年3月28日(2014.3.28)		3 9 2 5 番
(33) 優先権主張国・地域又は機関	カナダ (CA)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変されたC P M Vエンハンサーエレメント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

順番に、C P M V 5' U T Rおよびスタッファーフラグメントを含む発現エンハンサーであって、C P M V 5' U T Rが配列番号：1のヌクレオチド1 - 1 6 0からなり、ここでヌクレオチド1 1 5 - 1 1 7がA T Gまたは非A T Gコドンであり、スタッファーフラグメントが不完全なMタンパク質をコードするヌクレオチド配列および1つ以上のコザック配列を含み、不完全なMタンパク質が配列番号：1のヌクレオチド1 6 1 - 5 0 9を含み、ここでヌクレオチド1 6 1 - 1 6 3がA T Gまたは非A T Gコドンであり、1つ以上のコザック配列がヌクレオチド配列A G A A A、A G A C A、A G G A AまたはA A G C Aを含む、発現エンハンサー。

【請求項 2】

スタッファーフラグメントが3 4 9から約5 0 0のヌクレオチド長、またはそれらの間の任意の長さを含む、請求項 1 に記載の発現エンハンサー。

【請求項 3】

スタッファーフラグメントが、マルチブルクローニングサイトをさらに含む、請求項 2 に記載の発現エンハンサー。

【請求項 4】

不完全なMタンパク質をコードするヌクレオチド配列が、3 4 9または3 5 1ヌクレオチド長のいずれかである、請求項 1 に記載の発現エンハンサー。

【請求項 5】

C P M V 5' U T Rのヌクレオチド1 1 5がアデニンまたはグアニンである、請求項1に記載の発現エンハンサー。

【請求項6】

請求項1に記載の発現エンハンサーおよび目的のヌクレオチド配列と作動可能に連結される制御領域を含む核酸配列を含む、植物発現系。

【請求項7】

コモウイルス3' U T Rをさらに含む、請求項6に記載の植物発現系。

【請求項8】

サイレンシングのサプレッサーをコードする第二の核酸配列をさらに含む、請求項7に記載の植物発現系。

【請求項9】

サイレンシングのサプレッサーが、H c P r oおよびp 1 9 からなる群から選択される、請求項8に記載の植物発現系。

【請求項10】

制御領域が、プラストシアニンプロモーター、C a M V 3 5 Sプロモーター、2 x C a M V 3 5 Sプロモーター、C A Sプロモーター、R b c Sプロモーター、U b iプロモーター、またはアクチンプロモーターからなる群から選択される、請求項6に記載の植物発現系。

【請求項11】

目的のヌクレオチド配列が、ウイルスタンパク質または抗体をコードする、請求項6に記載の植物発現系。

【請求項12】

ウイルスタンパク質が、H 1、H 2、H 3、H 4、H 5、H 6、H 7、H 8、H 9、H 1 0、H 1 1、H 1 2、H 1 3、H 1 4、H 1 5、H 1 6、およびインフルエンザB型ヘマグルチニンからなる群から選択されるインフルエンザヘマグルチニンである、請求項11に記載の植物発現系。

【請求項13】

ウイルスタンパク質または抗体をコードするヌクレオチド配列が、天然シグナルペプチド配列、または非天然シグナルペプチドを含む、請求項12に記載の植物発現系。

【請求項14】

非天然シグナルペプチドが、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(P D I)由来である、請求項13に記載の植物発現系。

【請求項15】

請求項6に記載の植物発現系を植物または植物の部分に導入すること、および目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする条件下で、植物もしくは植物の部分にインキュベートすることを含む、植物または植物の部分において目的のタンパク質を生産する方法。

【請求項16】

請求項6に記載の植物発現系を用いて一過性に遺伝子導入されている、または安定的に形質転換されている、植物または植物の部分。

【請求項17】

目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結される、請求項1に記載の発現エンハンサーを含む核酸。

【請求項18】

目的のヌクレオチド配列が、B H A、C、H 1、H 2、H 3、H 4、H 5、H 6、H 7、H 8、H 9、H 1 0、H 1 1、H 1 2、H 1 3、H 1 4、H 1 5、およびH 1 6から選択されるインフルエンザヘマグルチニン(H A)である、請求項17に記載の核酸。

【請求項19】

H Aが、H Aの天然膜貫通ドメインが、異種の膜貫通ドメインと置き換わっているキメラH Aである、請求項18に記載の核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

異種の膜貫通ドメインが、H1 California から得られる、請求項 19 に記載の核酸。

【請求項 21】

不完全な M タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、配列番号：1 - 4 のいずれかのヌクレオチド 161 から 509、配列番号：55 のヌクレオチド 161 - 511、または配列番号：56 のヌクレオチド 161 - 511 を含む、請求項 1 に記載の発現エンハンサー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、植物における目的のタンパク質の発現に関する。本発明はまた、植物における目的のタンパク質の生産のための方法および組成物を提供する。

【背景技術】

【0002】

植物は、組換えタンパク質のための生産系として大きな可能性を提供する。植物において外来タンパク質を生産することへの 1 つのやり方は、安定なトランスジェニック植物系統を生成することである。しかしながら、これは時間がかかり、および労働集約的な工程である。トランスジェニック植物の代替は、植物ウイルスベクターの発現ベクターの使用である。植物ウイルスベクターは、植物における急速で、高レベルな一過性のタンパク質の発現を可能にする。

20

【0003】

植物における、高レベルで、一過性の外来タンパク質の発現を達成する 1 つの方法は、ササゲモザイクウイルス (Cowpea mosaic virus) (CPMV; 例えば、WO2007/135480; WO2009/087391; US 2010/0287670, Sainsbury F. et al., 2008, Plant Physiology; 148:121-1218; Sainsbury F. et al., 2008, Plant Biotechnology Journal; 6:82-92; Sainsbury F. et al., 2009, Plant Biotechnology Journal; 7:682-693; Sainsbury F. et al. 2009, Methods in Molecular Biology, Recombinant Proteins From Plants, vol. 483:25-39 を参照されたい) などのコモウイルスを含む、RNA 植物ウイルスに基づくベクターの使用を伴う。

30

【0004】

コモウイルスは、二分節ゲノムを有する RNA ウイルスである。コモウイルスの RNA ゲノムのセグメントは、RNA - 1 および RNA - 2 と称される。RNA - 1 は、VPg、複製酵素 (replicase) およびプロテアーゼタンパク質をコードする。ウイルスは、ウイルスのゲノムの複製のために当該複製酵素を必要とする。コモウイルス、ササゲモザイクウイルス (CPMV) の RNA - 2 は、4 つの機能性ペプチドにプロセッシングされる 105 kDa または 95 kDa のポリプロテインを生産する。

40

【0005】

CPMV RNA - 2 の 5' 領域は、115、161、512 および 524 位に開始コドン (AUG) を含む。161 および 512 位の開始コドンは、同一のトリプレットリーディングフレームにある。161 位の開始コドンでの開始は、105 K ポリプロテインの合成を生じる一方で、512 位の開始コドンでの開始は、95 K ポリプロテインの合成を指示する。CPMV における 512 位の開始コドンでの翻訳の開始は、161 位の開始より、より効率的であり、その結果、105 K ポリプロテインより多くの 95 K ポリプロテインの生産がもたらされる。115 位の開始コドンは、ウイルス複製にとって必須ではない (Wellink et al., 1993 Biochimie. 75(8):7

50

41 - 7)。

【0006】

CPMV RNA - 2における161および512位の開始部位間のフレームの維持は、RNA - 1にコードされる複製酵素によるRNA - 2の効率的な複製に必要とされる (Holness et al., 1989; Virology 172, 311 - 320; van Bokhoven et al., 1993, Virology 195, 377 - 386; Rohll et al., 1993 Virology 193, 672 - 679; Wellink et al., 1993, Biochimie. 75 (8): 741 - 7)。この要件は、CPMV RNA - 2発現ベクターの複製型における512開始コドンの上流に挿入されうる配列の長さに影響する。さらに、ポリリンカーの使用は、それらがこれらの開始部位間のオープンリーディングフレーム (ORF) をずらしうるので、慎重に使用されるべきである。

10

【0007】

CPMVは、植物における異種ポリペプチドの生産に適切なベクター系の開発のための基礎として役立っている (Liu et al., 2005 Vaccine 23, 1788 - 1792; Sainsbury et al., 2007 Virus Expression Vectors (Hefferon, K. ed), pp. 339 - 555)。これらの系は、RNA - 2の改変に基づくが、完全長型または欠失型が用いられるかどうかという点で異なる。改変RNA - 2の複製は、RNA - 1との共接種により達成される。外来タンパク質は、RNA - 2由来のポリプロテインのC - 末端に融合される。N - 末端ポリペプチドの解放は、口蹄疫ウイルス由来の2A触媒ペプチド配列の作用により媒介される (Gopinath et al., 2000, Virology 267: 159 - 173)。得られるRNA - 2分子は、植物内および植物間の両方に拡散することができる。この戦略は、ササゲ (cowpea) 植物において、B型肝炎コア抗原 (HBcAg) および小免疫タンパク質 (SIPs) などの多くの組換えタンパク質を発現するために使用されてきた (Mechtcheriakova et al. J. Virol. Methods 131, 10 - 15; 2006; Monger et al., 2006, Plant Biotechnol. J. 4, 623 - 631; Alamillo et al., 2006, Biotechnol. J. 1, 1103 - 1111)。成功にもかかわらず、完全長のウイルスベクターの使用は挿入される配列のサイズを制限し、かつ植物間の移動はウイルスの生物学的封じ込めについて懸念される。

20

30

【0008】

生物学的封じ込め、および挿入サイズの問題に対処するために、Canizaresらは、RNA - 2のコーディング領域の大部分を目的の配列に置換し、CPMV RNA - 2の無効なバージョン (deIRNA - 2) を生産した (2006 Plant Biotechnol. J. 4: 183 - 193)。RNA - 2の512位のAUG、3'非翻訳領域 (UTR) のすぐ上流に、発現される配列を融合し、RNA - 2を模倣する分子を作製した。かかる構築物は、RNA - 1およびサイレンシングサプレッサーの存在下で植物へ導入された際に複製でき、かつ実質的なレベルの異種タンパク質の合成を指示した (Sainsbury et al., 2008 Plant Biotechnol J. 6: 82 - 92)。

40

【0009】

CPMV RNA - 2ベクターにおける161位の開始コドンの変異 (U162C; HT) は、512位の開始コドンの後に挿入される配列によりコードされるタンパク質の発現レベルを増加させる。これはウイルス複製を必要としない外来タンパク質の高レベルの生産を可能にし、かつCPMV - HT系と命名された (WO2009/087391; Sainsbury and Lomonossoff, 2008, Plant Physiol. 148, 1212 - 1218)。pEAQ発現プラスミドにおいて (Sainsbury et al., 2009, Plant Biotechnology Jo

50

urnal, 7, pp 682 - 693; US 2010/0287670)、発現される配列は、5' UTRおよび3' UTR間に位置している。pEAQシリーズにおける5' UTRは、U162C(HT)変異を保有する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、植物における目的のタンパク質の発現に関する。本発明はまた、植物における目的のタンパク質の生産のための方法および組成物を提供する。

【0011】

本明細書に記載されるように、順番に、配列番号：1のヌクレオチド1 - 160を含む、または配列番号：1と約80%から100%の配列類似性を含むヌクレオチド配列を含むCPMV 5' UTRヌクレオチド配列、ならびに不完全なMタンパク質、植物において活性な1つ以上のコザック配列、もしくは両方をコードするヌクレオチド配列を含むスタッファーフラグメントを含む、発現エンハンサーが提供される。スタッファーフラグメントは、10から約500のヌクレオチド長、またはそれらの間の任意の長さを含んでもよい。スタッファーフラグメントの不完全なMタンパク質は、約10から約351のヌクレオチド長、またはそれらの間の任意の長さを含んでもよい。スタッファーフラグメントは、マルチブルクローニングサイトをさらに含んでもよい。マルチブルクローニングサイトは、約0から約100のヌクレオチド長、またはそれらの間の任意の長さを含む。

【0012】

コザック配列が、配列番号：5 - 17に示される配列の群から選択される、上記に記載される発現エンハンサーもまた提供される。

【0013】

順番に、配列番号：1のヌクレオチド1 - 160を含む、または配列番号：1と約80%から100%の配列類似性を含むヌクレオチド配列を含むCPMV 5' UTRヌクレオチド配列、ならびに不完全なMタンパク質をコードするヌクレオチド配列および1つ以上の植物コザック配列をコードするヌクレオチド配列を含むスタッファーフラグメントを含む発現エンハンサーと作動可能に連結された制御領域を含む核酸配列を含む植物発現系であって、当該発現エンハンサーは目的のヌクレオチド配列と作動可能に連結されたものである、植物発現系もまた提供される。植物発現系はコモウイルス3' UTRをさらに含んでもよい。植物発現系は、サイレンシングのサブレッサー、例えばHcProまたはp19をコードする第二の核酸配列をさらに含んでもよい。

【0014】

上記で定義される植物発現系の目的のヌクレオチド配列は、ウイルスタンパク質または抗体をコードしてもよい。例えば、ウイルスタンパク質は、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、インフルエンザB型ヘマグルチニンの群から選択されてもよい。ウイルスタンパク質または抗体をコードするヌクレオチド配列は、天然シグナルペプチド配列、または非天然シグナルペプチドを含んでもよく、例えば非天然シグナルペプチドは、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)から得られてもよい。

【0015】

本明細書に記載されるように、植物または植物の部分に上記で定義される植物発現系を導入すること、および目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする条件下で、植物もしくは植物の部分にインキュベートすることを含む、植物または植物の部分において目的のタンパク質を生産する方法が提供される。

【0016】

本発明はまた、上記に記載される植物発現系を用いて一過性に遺伝子導入されている、または安定的に形質転換されている、植物または植物の部分を提供する。

【0017】

植物ベースの発現系は、好ましくは、例えば、目的の遺伝子にとって便利なクローニン

10

20

30

40

50

グ部位を含有するなどの多くの特性を有し、費用対効果のある方法で植物に容易に感染してもよく、播種される植物の効率的な局所または全身感染を引き起こしてもよい。さらに、当該感染は、有用なタンパク質物質の良好な収率を提供するだろう。

【0018】

この発明の概要は、必ずしも発明の全ての特徴を記載するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0019】

本発明のこれらの、および他の特徴は、添付した図面による参照における以下の記載からより明らかとなるだろう：

【図1】図1Aは、目的のヌクレオチド配列に融合された、従来技術(CPMV HT)の、および本明細書に記載される(CPMV HT+)、エンハンサー配列の例の一般的な概略図を示す。この図に示されるエレメントの全てがエンハンサー配列内で必要とされなくてもよい。さらなるエレメントは、コモウウイルス3'非翻訳領域(UTR)、プラストシアニン3'UTR、またはコモウウイルス3'UTRおよびプラストシアニン3'UTRの組み合わせをコードする配列を含む、目的のヌクレオチド配列の3'末端(図示せず)で含まれてもよい。図1Bは、それらの5'末端で植物制御領域(これらの非限定例2X35Sにおける)、およびそれらの3'末端で、スタッファーフラグメント、ATG開始部位を含む、目的のヌクレオチド配列、「GOI」に作動可能に連結された、従来技術(CPMV HT)に記載されるエンハンサー配列を含む構築物、および本発明(CPMV HT+)に記載されるエンハンサー配列を含む構築物を示す。これらの例において、CPMV HTのためのスタッファーフラグメントは、不完全なMタンパク質およびマルチプルクローニングサイトを含み、かつCPMV HT+についての例では、スタッファーフラグメントは、不完全なMタンパク質、マルチプルクローニングサイトおよび植物コザック配列を含む。

【図2】図2は、目的のヌクレオチド配列と作動可能に連結されるCPMV-HT(従来技術)発現構築物、およびCPMV-HT+ベースの発現構築物を含む植物において生産されるタンパク質の粗タンパク質の抽出物における相対血液凝集力価(HMG)を示す。PDIシグナルペプチドを有するH1 A/California/07/2009(構築物番号484: CPMV HT; および構築物番号1805: CPMV HT+; 実施例4を参照されたい)、PDIシグナルペプチドを有するH3 A/Victoria/361/2011(構築物番号1391: CPMV HT; および構築物番号1819: CPMV HT+; それぞれ実施例1および2を参照されたい)、欠失タンパク質分解ループを有し、かつPDIシグナルペプチドを有するB Brisbane/60/08(構築物番号1039: CPMV HT; および構築物番号1829: CPMV HT+; 実施例8を参照されたい)、欠失タンパク質分解ループを有し、H1 A/California/07/2009のものによって置換された膜貫通ドメインおよび細胞質側末端を有し、かつPDIシグナルペプチドを有するB Brisbane/60/08+H1 TM(構築物番号1067: CPMV HT; および構築物番号1875: CPMV HT+; 実施例9を参照されたい)、欠失タンパク質分解ループを有し、かつPDIシグナルペプチドを有するB Massachusetts/2/2012(構築物番号2072: CPMV HT; および構築物番号2052: CPMV HT+; 実施例10を参照されたい)、欠失タンパク質分解ループを有し、H1 A/California/07/2009のものによって置換された膜貫通ドメインおよび細胞質側末端を有し、かつPDIシグナルペプチドを有するB Massachusetts/2/2012+H1 Tm(構築物番号2074: CPMV HT; および構築物番号2062: CPMV HT+; 実施例11を参照されたい)、欠失タンパク質分解ループを有し、かつ天然シグナルペプチドを有するB Wisconsin/1/2010(構築物番号1445: CPMV HT; および構築物番号1839: CPMV HT+; 実施例12を参照されたい)、および欠失タンパク質分解ループを有し、H1 A/California/07/2009のものによって置換された膜貫通ドメインおよび細胞質側末端を有し、かつ天然シ

10

20

30

40

50

グナルペプチドを有する B W i s c o n s i n / 1 / 2 0 1 0 + H 1 T m (構築物番号 1 4 5 4 : C P M V H T ; および構築物番号 1 8 6 0 : C P M V H T + ; 実施例 1 3 を参照されたい) 由来の、H A の発現データが示される。

【図 3】図 3 は、C P M V - H T (従来技術) 発現構築物、および C P M V H T + ベースの発現構築物を含む植物において生産されるタンパク質の粗タンパク質の抽出物における相対血液凝集力価 (H M G) を示す。P D I シグナルペプチドを有するインフルエンザ A / I n d o n e s i a / 5 / 2 0 0 5 由来の H 5 (H 5 I n d o ; 構築物番号 4 0 9 : C P M V H T ; および構築物番号 2 3 1 9 : C P M V H T + ; 実施例 5 を参照されたい)、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを有するインフルエンザ A / H a n g z h o u / 1 / 2 0 1 3 由来の H 7 (H 7 H a n ; 構築物番号 2 1 4 0 : C P M V H T ; および構築物番号 2 1 4 2 : C P M V H T + ; 実施例 6 を参照されたい)、インフルエンザ A / I n d o n e s i a / 5 / 2 0 0 5 由来の H 5 の膜貫通ドメインおよび細胞質側末端 (T M C T) に融合され、かつアルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのシグナルペプチドを有する、インフルエンザ A / H a n g z h o u / 1 / 2 0 1 3 由来の H 7 (H 7 H a n + H 5 T m ; 構築物番号 2 1 3 0 : C P M V H T ; 構築物番号 2 1 4 6 : C P M V H T + ; 実施例 7 を参照されたい) についての発現データが示される。

【図 4】図 4 A は、試験された植物コザック配列のバリエーションの例を示す。C P M V H T + 、植物制御領域、5 ' U T R 、スタッパーフラグメント、および目的のヌクレオチド配列 (G O I) の部分的な配列を示す構築物。この非限定例において、構築物は、2 X 3 5 S 制御領域、不完全な M タンパク質およびマルチプルクローニングサイト (制限酵素部位)、植物コザック配列を含むスタッパーフラグメントを含む C P M V H T + を含む (目的のヌクレオチド配列の 5 ' 末端は、また: 「A T G . . . G O I 」と示され; ここで G O I は H 3 A / V i c t o r i a / 3 6 1 である)。植物コザック配列のバリエーションはまた、配列の下に示される (図 7 も参照されたい)。それぞれのバリエーション植物コザック配列は、スタッパーフラグメントの 3 ' 末端と目的のヌクレオチド配列 (これらの非限定例において、H 3 A / V i c t o r i a / 3 6 1) の 5 ' - A T G 部位の間に配置された。構築物の他のエレメント同一のままである。図 4 B は、示される C P M V H T + 発現構築物およびバリエーション植物コザック配列を含む植物において生産される目的のヌクレオチド配列の H A 力価を示す。

【図 5】図 5 は、構築物番号 1 3 9 1 (A - 2 X 3 5 S C P M V - H T P D I S P H 3 V i c t o r i a N O S ; 実施例 1 を参照されたい) を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号 1 3 9 1 は、従来技術の C P M V - H T 配列 (不完全な M タンパク質をコードする配列に融合される 1 6 1 位の変異開始コドンを含む C P M V 5 ' U T R) を組み込み、かつ 5 ' U T R と目的のヌクレオチド配列 (P D I S P / H 3 V i c t o r i a) との間に異種のコザック配列を含まない。P D I S P : タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド。N O S : ノパリンシンターゼターミネーター。図 5 A は、プライマー配列 I F - P D I . S 1 = 3 c (配列番号: 1 8) を示す。図 5 B は、プライマー配列 I F - H 3 V 3 6 1 1 1 . s 1 - 4 r (配列番号: 1 9) を示す。図 5 C は、P D I S P / H 3 V i c t o r i a の配列 (配列番号: 2 0) を示す。図 5 D は、構築物 1 1 9 1 の概略図を示す。図 5 E は、構築物 1 1 9 1 を示し; 左から右に、t - D N A ボーダー (下線)、プラスチアニン - P 1 9 - プラスチアニンサイレンシングインヒビター発現カセットを有する 2 X 3 5 S C P M V - H T N O S (配列番号: 2 1)。図 5 F は、2 X 3 5 S プロモーターから N O S ターミネーターまでの発現カセット番号 1 3 9 1 を示す。P D I S P / H 3 V i c t o r i a ヌクレオチド配列に下線が引かれ; C P M V 5 ' U T R は太字で示され; 不完全な M タンパク質 (配列番号: 2 2) はイタリックである。図 5 G は、P D I S P / H 3 V i c t o r i a のアミノ酸配列 (配列番号: 2 3) を示す。図 5 H は、構築物番号 1 3 9 1 の (参照構築物) 概略図を示す。

【図 6】図 6 は、構築物番号 1 8 1 9 (2 X 3 5 S C P M V - H T + P D I S P H

3 *Victoria* NOS ; 実施例 1 を参照されたい) を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号 1819 は、CPMV - HT + 配列 (不完全な M タンパク質をコードするスタッパーフラグメントに融合される 161 位の変異開始コドン、マルチプルクローニングサイトを有する CPMV 5' UTR) を組み込み、かつマルチプルクローニングサイトと目的のヌクレオチド配列 (PDISP/H3 *Victoria*) 間に植物コザック配列を含む)。PDISP: タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド。NOS: ノパリンシンターゼターミネーター。図 6A は、プライマー配列 IF (SacII) - Kozac - PDI . c (配列番号: 24) を示す。図 6B は、構築物 2181 の概略図を示す。図 6C は、構築物 2181 についての配列を示す (左から右に、t - DNA ボーダーに下線が引かれ; プラストシアニン - P19 - プラストシアニンサイレンシング阻害剤発現カセットを有する 2X35S / CPMV - HT + / NOS ; 配列番号: 25)。図 6D は、2X35S プロモーターから NOS ターミネーターまでの発現カセット番号 1819 を示す。PDISP/H3 *Victoria* ヌクレオチド配列に下線が引かれる (配列番号: 26)。図 6E は、構築物 1819 の概略図を示す。

図 7 は、「CPMV HT +」ベースの構築物 (構築物番号 1952 から 1959) の選択を調製するために使用される植物コザック配列におけるバリエーションを含む配列を示す。植物コザック配列におけるバリエーションを含む、2X35S / CPMV HT + / NOS 発現系における SacII 制限酵素部位および PDISP/H3 *Victoria* の ATG 間の配列のバリエーションが示される (構築物 1819 由来の対応する配列からのバリエーションとして当該配列が示される; 実施例 2 を参照されたい)。バリエーション植物コザック配列に下線が引かれる。PDISP: タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド。図 7A は、IF - HT1* - PDI . c のヌクレオチド配列 (配列番号: 27; 構築物番号 1952 を調製するために使用される) を示す。図 7B は、IF - HT2* - PDI . c のヌクレオチド配列を示す (配列番号: 28; 構築物番号 1953 を調製するために使用される)。図 7C は、IF - HT3* - PDI . c のヌクレオチド配列を示す (配列番号: 29; 構築物番号 1954 を調製するために使用される)。図 7D は、IF - HT4* - PDI . c のヌクレオチド配列を示す (配列番号: 30; 構築物番号 1955 を調製するために使用される)。図 7E は、IF - HT5* - PDI . c のヌクレオチド配列を示す (配列番号: 31; 構築物番号 1956 を調製するために使用される)。図 7F は、IF - HT6* - PDI . c のヌクレオチド配列を示す (配列番号: 32; 構築物番号 1957 を調製するために使用される)。図 7G は、IF - HT7* - PDI . c のヌクレオチド配列を示す (配列番号: 33; 構築物番号 1958 を調製するために使用される)。図 7H は、IF - HT8* - PDI . c のヌクレオチド配列を示す (配列番号: 34; 構築物番号 1959 を調製するために使用される)。図 7I は、配列番号: 27 (図 7A) を用いる植物コザック配列 (コザック 1) を含む構築物番号 1952 の概略図を示す。それぞれの構築物 (1953 - 1959) がそれぞれ図 7B から 7H (配列番号: 28 から 34) に示される改変植物コザック配列 (コザック 1) を含むことを除き、構築物 1953 - 1959 は、構築物 1952 と同一の特徴を含む。

【図 8】図 8 は、構築物番号 484 および 1805 (それぞれ、2X35S / CPMV HT PDISP/H1 *California* NOS および 2X35S / CPMV HT + PDISP/H1 *California* NOS ; 実施例 4 を参照されたい) を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号 484 は、従来技術の CPMV - HT 配列 (不完全な M タンパク質をコードする配列に融合される 161 位の変異開始コドンを有する CPMV 5' UTR) を組み込み、かつ 5' UTR と目的のヌクレオチド配列 (PDISP/H1 *California*) の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号 1805 は、160 ヌクレオチドを含む CPMV 5' UTR、不完全な M タンパク質を含むスタッパーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつ CPMV HT + ベースの構築物の一例である。PDISP: タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド。NOS: ノパリンシンターゼターミネーター。図 8A は、PDISP/H1 *California* のヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド配列（配列番号：35）を示す。図8Bは、PDISP/H1 Californiaのアミノ酸配列（配列番号：36）を示す。図8Cは、構築物番号484（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図8Dは、構築物番号1805（2X35S/CPMV HT+）の概略図を示す。

【図9】図9は、構築物番号409および2319（それぞれ、2X35S/CPMV HT PDISP/H5 Indonesia NOS；CPMV HT+ PDISP/H5 Indonesia NOS；実施例5を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号409は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドンを含むCPMV 5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的のヌクレオチド配列（PDISP/H5 Indonesia）の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号2319は、160ヌクレオチドを含むCPMV 5'UTR、不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつCPMV HT+ベースの構築物の一例である。NOS：ノパリンシンターゼターミネーター。図9Aは、PDISP/H5 Indonesiaのヌクレオチド配列（配列番号：37）を示す。図9Bは、PDISP/H5 Indonesiaのアミノ酸配列（配列番号：38）を示す。図9Cは、構築物番号409（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図9Dは、構築物番号2319（2X35S/CPMV HT+）の概略図を示す。

【図10】図10は、構築物番号2140および2142（それぞれ、2X35S/CPMV HT H7 Hangzhou NOS；CPMV HT+ H7 Hangzhou NOS；実施例6を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号2140は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドンを含むCPMV 5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的のヌクレオチド配列（PDISP/H7 Hangzhou）の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号2142は、160ヌクレオチドを含むCPMV 5'UTR、不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつCPMV HT+ベースの構築物の一例である。NOS：ノパリンシンターゼターミネーター。図10Aは、天然のH7 Hangzhouのヌクレオチド配列（配列番号：39）を示す。図10Bは、天然のH7 Hangzhouのアミノ酸配列（配列番号：40）を示す。図10Cは、構築物番号2140（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図10Dは、構築物番号2142（2X35S/CPMV HT+）の概略図を示す。

【図11】図11は、構築物番号2130および2146（それぞれ、2X35S/CPMV HT H7 Hangzhou+H5 Indonesia TMCT NOS；CPMV HT+ H7 Hangzhou+H5 Indonesia TMCT NOS；実施例7を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号2130は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドンを含むCPMV 5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的のヌクレオチド配列（PDISP/H7 Hangzhou+H5 Indonesia TMCT）の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号2146は、160ヌクレオチドを含むCPMV 5'UTR、不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつCPMV HT+ベースの構築物の一例である。NOS：ノパリンシンターゼターミネーター。図11Aは、H7 Hangzhou+H5 Indonesia TMCTのヌクレオチド配列（配列番号：41）を示す。図11Bは、H7 Hangzhou+H5 Indonesia TMCTのアミノ酸配列（配列番号：42）を示す。図11Cは、構築物番号2130（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図11Dは、構築物番号2146（2X35S/CPMV HT+）の概略図を示す。

10

20

30

40

50

図を示す。

【図12】図12は、構築物番号1039および1829（それぞれ、2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Brisbane (PrL-) NOSおよび2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Brisbane (PrL-) NOS；実施例8を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号1039は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドンを含むCPMV 5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的のヌクレオチド配列（PDISP/HA B Brisbane (PrL-)）の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号1829は、160ヌクレオチドを含むCPMV 5'UTR、不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつCPMV HT+ベースの構築物の一例である。PDISP：タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド；NOS：ノパリンシンターゼターミネーター；PrL-：欠失タンパク質分解ループ。図12Aは、PDISP/HA B Brisbane (PrL-)のヌクレオチド配列（配列番号：43）を示す。図12Bは、PDISP/HA B Brisbane (PrL-)のアミノ酸配列を示す；配列番号：44）。図12Cは、構築物番号1039（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図12Dは、構築物番号1829（2X35S/CPMV HT+）の概略図を示す。

【図13】図13は、構築物番号1067および1875（それぞれ、2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCT NOSおよび2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCT NOS；実施例9を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号1067は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドンを含むCPMV 5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的のヌクレオチド配列（PDISP/HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCT）の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号1875は、160ヌクレオチドを含むCPMV 5'UTR、不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつCPMV HT+ベースの構築物の一例である。PDISP：タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド；NOS：ノパリンシンターゼターミネーター；PrL-：欠失タンパク質分解ループ；TMCT：膜貫通ドメイン細胞質側末端。図13Aは、PDISP/HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCTのヌクレオチド配列（配列番号：45）を示す。図13Bは、PDISP/HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCTのアミノ酸配列（配列番号：46）を示す。図13Cは、構築物番号1067（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図13Dは、構築物番号1875（2X35S/CPMV 160+）の概略図を示す。

【図14】図14は、構築物番号2072および2052（それぞれ、2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) NOSおよび2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) NOS；実施例10を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号2072は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドンを含むCPMV 5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的のヌクレオチド配列（PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)）の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号2052は、160ヌクレオチドを含むCPMV 5'UTR、不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつCPMV HT+ベースの構築物の一例である。PDISP：タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド；NOS：ノパリンシンターゼ

10

20

30

40

50

ターミネーター；PrL-：欠失タンパク質分解ループ。図14Aは、PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)のヌクレオチド配列（配列番号：47）を示す。図14Bは、PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)のアミノ酸配列（配列番号：48）を示す。図14Cは、構築物番号2072（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図14Dは、構築物番号2052（2X35S/CPMV HT+）の概略図を示す。

【図15】図15は、構築物番号2074および2062（それぞれ、2X35S/CPMV HT PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT NOSおよび2X35S/CPMV HT+ PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT NOS；実施例11を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号2074は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドン（5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的のヌクレオチド配列（PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT）の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号2062は、160ヌクレオチドを含むCPMV 5'UTR、不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつCPMV HT+ベースの構築物の一例である。PDISP：タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド；NOS：ノバリンシンターゼターミネーター；PrL-：欠失タンパク質分解ループ；TMCT：膜貫通ドメイン細胞質側末端。図15Aは、PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCTのヌクレオチド配列（配列番号：49）を示す。図15Bは、PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCTのアミノ酸配列（配列番号：50）を示す。図15Cは、構築物番号2074（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図15Dは、構築物番号2062（2X35S/CPMV HT+）の概略図を示す。

【図16】図16は、構築物番号1445および1839（それぞれ、2X35S/CPMV HT HA B Wisconsin (PrL-) NOS、および2X35S/CPMV HT+ HA B Wisconsin (PrL-) NOS；実施例12を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号1445は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドン（5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的のヌクレオチド配列（HA B Wisconsin (PrL-)）の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号1839は、160ヌクレオチドを含むCPMV 5'UTR、不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつCPMV HT+ベースの構築物の一例である。PrL-：欠失タンパク質分解ループ；NOS：ノバリンシンターゼターミネーター。図16Aは、HA B Wisconsin (PrL-)のヌクレオチド配列（配列番号：51）を示す。図16Bは、HA B Wisconsin (PrL-)のアミノ酸配列（配列番号：52）を示す。図16Cは、構築物番号1445（2X35S/CPMV HT；参照構築物）の概略図を示す。図16Dは、構築物番号1839（2X35S/CPMV HT+）の概略図を示す。

【図17】図17は、構築物番号1454および1860（それぞれ、2X35S/CPMV HT HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT NOSおよび2X35S/CPMV HT+ HA B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT NOS；実施例13を参照されたい）を調製するために使用される配列構成要素を示す。構築物番号1454は、従来技術のCPMV-HT配列（不完全なMタンパク質をコードする配列に融合される161位の変異開始コドン（5'UTR）を組み込み、かつ5'UTRと目的

10

20

30

40

50

のヌクレオチド配列 (H A B W i s c o n s i n (P r L -) + H 1 C a l i f o r n i a T M C T) の間に異種のコザック配列を含まない。構築物番号 1 8 6 0 は、1 6 0 ヌクレオチドを含む C P M V 5 ' U T R、不完全な M タンパク質を含むスタッファーフラグメント、マルチプルクローニングサイト、および植物コザック配列を含み、かつ C P M V H T + ベースの構築物の一例である。N O S : ノパリンシンターゼターミネーター ; P r L - : 欠失タンパク質分解ループ ; T M C T : 膜貫通ドメイン細胞質側末端。図 1 7 A は、H A B W i s c o n s i n (P r L -) + H 1 C a l i f o r n i a T M C T のヌクレオチド配列 (配列番号 : 5 3) を示す。図 1 7 B は、P D I S P / H A B W i s c o n s i n (P r L -) + H 1 C a l i f o r n i a T M C T のアミノ酸配列 (配列番号 : 5 4) を示す。図 1 7 C は、構築物番号 1 4 5 4 (2 X 3 5 S / C P M V H T ; 参照構築物) の概略図を示す。図 1 7 D は、構築物番号 1 8 9 3 (2 X 3 5 S / C P M V H T +) の概略図を示す。

10

【 0 0 2 0 】

詳細な説明

本発明は、植物における目的のタンパク質の発現に関する。本発明はまた、植物における目的のタンパク質の生産のための方法および組成物を提供する。

【 0 0 2 1 】

以下の記載において、多くの用語は広く使用され、以下の定義は発明の種々の態様の理解を容易にするために提供される。用語の例を含む、本明細書における例の使用は、例示的な目的のみのためであり、かつ本明細書の発明の実施形態の範囲および意味を限定することを企図するものではない。

20

【 0 0 2 2 】

本明細書で使用されるように、用語「を含む」と併せて本明細書で使用される際に、単語「a」または「an」の使用は、「1つの」を意味してもよいが、それらはまた、「1つ以上の」、「少なくとも1つの」および「1より大きい」の意味と一致する。用語「約」は、指定される値からおよそ + / - 10 % のバリエーションを指す。用語「複数 (p l u r a l i t y) 」は、1より大きいこと、例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上等を意味する。

【 0 0 2 3 】

本発明は、コモウイルス 5 ' 非翻訳領域 (U T R)、および改変された、延長された、またはトランケートされたスタッファー配列を含む、植物において目的のタンパク質を生産するための核酸、発現エンハンサーおよび発現系を提供する。目的の配列を含む植物細胞、植物組織、植物全体、接種源、核酸、構築物、ならびに植物において目的のタンパク質を発現する方法も提供される。

30

【 0 0 2 4 】

本発明の発現エンハンサーの一例は、図 1 A に示される C P M V H T + を含むが、これに限定されない。C P M V H T + のヌクレオチド配列の非限定例は、配列番号 : 1、3 および 4 を参照して提供される。

【 0 0 2 5 】

植物宿主内の目的のヌクレオチド配列の発現を駆動するために、発現エンハンサー C P M V H T + を、植物において活性な制御領域とエンハンサー配列の 5 ' 末端で作動可能に連結してもよく、かつ発現エンハンサーの 3 ' 末端で目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結してもよい (図 1 A) 。

40

【 0 0 2 6 】

いずれかの C P M V H T + を用いる、植物において1つ以上の目的のタンパク質を生産するための発現系もまた提供される。本明細書に記載の発現系は、C P M V H T +、または C P M V H T + と 80 % から 100 % まで、またはそれらの間の任意の量の配列類似性を含む配列を含む、発現力セットを含む。C P M V H T + を含む発現力セットは、発現エンハンサーの 5 ' 末端に作動可能に連結された、植物において活性な制御領域をさらに含んでもよい。目的のヌクレオチド配列は、発現力セットの 3 ' 末端に作動可能に

50

連結してもよく、その結果、植物内に導入される時に、植物宿主内の目的のヌクレオチド配列の発現を達成する。

【0027】

図1Aおよび1Bを参照すると、改変されたMタンパク質と共に、コモウウイルスゲノム由来の5'UTR配列(コモウウイルス5'UTR)を含む発現エンハンサーが示される。図1Aおよび1Bでは、不完全なMタンパク質を含む、従来技術のCPMV-HTエンハンサー(Sainsbury and Lomonosoff, 2008, Plant Physiology; 148:1212-1218; WO 2009/087391; 出典明示により本明細書に組み込まれる)が、本発明のCPMV-HT+と共に示される。

10

【0028】

従来技術のCPMV-HT発現エンハンサー(Sainsbury and Lomonosoff, 2008, Plant Physiology; 148:1212-1218; WO 2009/087391; 出典明示により本明細書に組み込まれる)は、配列番号:2のヌクレオチド161-509を含む不完全なMタンパク質であって、162位の改変ATG(ATGが、ACGに改変されている)からなる不完全なMタンパク質およびリンカー配列に融合された、115位の改変ATG(ATGがCGTに改変されている)を有するCPMV-5'UTRのヌクレオチド1-160を含む(配列番号:2を参照されたい)。目的のヌクレオチド配列は、リンカー配列の3'末端に融合される(図1Aおよび1Bを参照されたい)。従来技術のCPMV-HTは、目的のヌクレオチド配列が発現エンハンサーに融合される位置からすぐ上流の植物コザック配列を欠く。

20

【0029】

本発明のCPMV-HT+は、改変され、かつ改変ATG(161-163位でATGがACGに改変されており;162位で「T」が「C」に改変されている)、不完全なMタンパク質、リンカー配列および植物コザック配列を含む、スタッファ配列に融合されている、115-117位の改変ATG(ここでATGはGTGに改変されており;115位のAがGに改変されている)を有するCPMV-5'UTRのヌクレオチド1-160を含んでもよい。CPMV-HT+ヌクレオチド配列の非限定例は配列番号:1および4に示される。目的のヌクレオチドは、コザック配列、例えばCPMV-HT+の植物コザック配列の3'末端に融合されてもよい(図1Aおよび1Bを参照されたい)。

30

【0030】

また、本発明の発現エンハンサーの5'UTRは、115位で「A」を含んでもよく、かつ、改変され、かつACGへのヌクレオチド161-163の改変ATG(ここで162位の「T」が、「C」に改変されている)、不完全なMタンパク質、リンカー配列および植物コザック配列を含む、スタッファ配列に融合されている、配列番号:4に示されるヌクレオチド115-117での天然のATG配列を含んでもよい。115位の天然型または野生型「A」を含む発現エンハンサーは、CPMV-HT+[WT115]と称されてもよい。CPMV-HT+[WT115]ヌクレオチド配列の非限定例は、配列番号:3に示される。目的のヌクレオチドは、CPMV-HT+[WT115]の植物コザック配列の3'末端に融合されてもよい(図1Aおよび1Bを参照されたい)。CPMV-HT+は、115位でヌクレオチド「G」を含む(配列番号:1)ので、CPMV-HT+[WT115]は、CPMV-HT+のバリエーションと考えてもよい。また、CPMV-HT+[511]は、ヌクレオチド161-511の不完全なMタンパク質を含む(配列番号:56を参照されたい)ので、CPMV-HT+[511]は、CPMV-HT+のバリエーションと考えてもよい。このように、「CPMV-HT+」という用語は、CPMV-HT+[WT115]およびCPMV-HT+[511]などのバリエーションを含む、総称である。

40

【0031】

CPMV-HT+発現エンハンサーの非限定例は配列番号:1、3および4に示されるが、しかしながら、スタッファフラグメントが不完全なMタンパク質を含み、かつ目的

50

のヌクレオチド配列に融合される場合は、植物において活性なコザック配列、例えば植物コザック配列が目的のヌクレオチド配列の5'末端に位置することを条件に、本発明から逸脱することなく、CPMV-HT+およびCPMV-HT+[WT115]のスタッファー配列中に変異(variation)または改変がなされてもよい、と理解されるべきである。CPMV-HT+発現エンハンサーの別の例(Mタンパク質-天然コザック配列を含む)は、配列番号:56に提供される(CPMV-HT+[511])。

【0032】

スタッファー配列は、挿入、トランケーションまたは欠失により改変されてもよく、その結果、従来技術エンハンサーCPMV-HT(Sainsbury and Lomonosoff, 2008, Plant Physiology; 148:1212-1218; WO 2009/087391; 出典明示により本明細書に組み込まれる)の最初の(未改変)不完全なMタンパク質配列と比較する場合、不完全なMタンパク質配列はより長くなり、トランケートされ、または短縮されている。不完全なMタンパク質に加えて、本発明のCPMV-HT+発現エンハンサーのスタッファー配列は、1つ以上の制限酵素部位(ポリリンカー、マルチブルクローニングサイト、1つ以上のクローニング部位)、1つ以上の植物コザック配列もしくはMタンパク質-天然コザック配列、1つ以上のリンカー配列、1つ以上の組換え部位、またはそれらの組み合わせをさらに含んでもよい。例えば、限定と考えられるべきではないが、スタッファー配列は、順番に、不完全なMタンパク質(配列番号:1もしくは2のヌクレオチド161-509、または配列番号:56のヌクレオチド161-511)、植物において活性なコザック配列、例えば植物コザック配列に融合された望ましい長さのマルチブルクローニングサイトを含んでもよい。

【0033】

目的のヌクレオチド配列は、様々なアプローチを用いて本発明のCPMV-HT+(またはCPMV-HT+[WT115]、またはCPMV-HT+[511])エンハンサー配列に融合(作動可能に連結)されてもよい。例えば、限定と考えられるべきではないが:

1) 目的のヌクレオチド配列、例えば目的のタンパク質をコードする核酸は、不完全なMタンパク質配列からなるスタッファーフラグメント(マルチブルクローニングサイトを有する、または有しない)のすぐ後のCPMV-HT+発現エンハンサーに融合されてもよい。この場合、目的のヌクレオチド配列は、不完全なMタンパク質配列(または、もしあればマルチブルクローニングサイト)の3'末端に融合されており、かつ目的のヌクレオチド配列は、その5'末端で、目的のヌクレオチド配列のATG開始部位からすぐ上流に植物コザック配列を含む。

2) 目的のヌクレオチド配列は、スタッファーフラグメントの3'末端に位置される植物コザック配列のすぐ後で、スタッファーフラグメント(不完全なMタンパク質、任意のマルチブルクローニングサイト、および植物コザック配列を含む)を含む発現エンハンサーに融合されてもよい。この場合、目的のヌクレオチド配列は、対応するマルチブルクローニングサイトまたは植物コザック配列を含まないだろう。

3) 目的のヌクレオチド配列は、マルチブルクローニングサイトを用いてCPMV-HT+発現エンハンサーに融合されてもよい。この場合、目的のヌクレオチド配列は、発現エンハンサーおよび目的のヌクレオチド配列のATG開始部位からすぐ上流の植物コザック配列との融合を可能にするために、その5'末端で対応するクローニング部位を含んでもよい。

【0034】

上記方法のいずれかを用いる全体的な結果は、5'UTR配列と作動可能に関連する(作動可能に連結される)植物制御領域を含む、構築物もしくは発現カセットであり、当該5'UTR配列は、植物コザック配列に融合された不完全なMタンパク質を含むスタッファーフラグメントの5'末端に融合され、ここで、植物コザック配列の3'末端は目的のヌクレオチド配列の5'末端に融合されている。構築物は、目的のヌクレオチド配列の3

’末端に作動可能に連結されるコモウウイルス3’非翻訳領域(UTR)、例えばプラストシアニン3’UTRもしくは植物内で活性な他の3’UTR、ならびにターミネーター配列、例えばNOSターミネーターを含む配列をさらに含んでもよい(図1Aを参照されたい)。

【0035】

本明細書に記載される、1つまたは1より多くの発現エンハンサー(例えばCPMV HT+、CPMV HT+[WT115]、CPMV HT+[511])と作動可能に連結される制御領域および目的のヌクレオチド配列を含む、第一の核酸配列を含む植物発現系もまた提供される。さらに、プロモーター(制御領域)配列、コモウウイルス5’UTRを含む発現エンハンサー(例えばCPMV HT+、CPMV HT+[WT115]、またはCPMV HT+[511])および1つ以上の目的のタンパク質をコードする1つ以上の核酸配列に融合された、植物コザック配列を有するスタッファ配列を含む核酸が記載される。当該核酸は、目的のヌクレオチド配列の3’末端に作動可能に連結される、コモウウイルス3’非翻訳領域(UTR)、例えばプラストシアニン3’UTR、もしくは植物において活性な他の3’UTR、ならびにターミネーター配列、例えばNOSターミネーターを含む配列をさらに含んでもよく(図1Aを参照されたい)、その結果、目的のヌクレオチド配列は、コモウウイルス3’非翻訳領域(UTR)、プラストシアニン3’UTR、または他の3’UTR配列より上流に挿入される。

【0036】

「作動可能に連結される」により、核酸配列の発現の媒介または調節などの意図される機能を実施するために、直接的または間接的のいずれかで、特定の配列が相互作用することが意味される。作動可能に連結された配列の相互作用は、例えば、作動可能に連結された配列と相互作用するタンパク質により媒介されてもよい。

【0037】

本明細書で参照される「発現エンハンサー」、「エンハンサー配列」または「エンハンサーエレメント」は、配列番号:1のヌクレオチド1-160に由来する、または約80%から100%、もしくはそれらの間の任意の量の配列類似性を共有する、配列を含む。エンハンサー配列は、それが取り付けられた下流の異種のオープンリーディングフレーム(ORF)の発現を増強できる。

【0038】

「5’UTR」または「5’非翻訳領域」または「5’リーダー配列」という用語は、翻訳されないmRNAの領域を指す。5’UTRは、典型的に転写開始部位で始まり、かつコーディング領域の翻訳開始部位または開始コドン(通常mRNA中ではAUG、DNA配列中ではATG)の直前で終結する。5’UTRは、長さにおいて、またはコドンが開始コドンとしてもはや機能せず、翻訳が代替開始部位で開始しうるように、自然に存在する開始コドンまたは翻訳開始部位に変異を導入することによって、改変されてもよい。例えば天然型CPMV 5’UTRの115、161、512、524位またはそれらの組み合わせで開始するATGは、ATG配列を除去するように、例えばACG、GTG、またはCGTまたは他の非ATG配列に改変されてもよい。

【0039】

「不完全なMタンパク質」により、配列番号:1のヌクレオチド161-509、または配列番号:56のヌクレオチド161-511の、約10から約351ヌクレオチド、またはそれらの間の任意の量を含むMタンパク質コーディング配列が意味される。配列番号:1のヌクレオチド161-509、または配列番号:56のヌクレオチド161-511は、天然型CPMV RNA 2ゲノム配列(本明細書中の配列番号:55を参照されたい;WO2009/087391の表1も参照されたい;出典明示により本明細書に組み込まれる)に示されるMタンパク質の配列に対応しており、「atg」開始部位を除去するように161-163位の1つ以上のヌクレオチドに改変(置換)を有する。不完全なMタンパク質配列の非限定例は、配列番号:1-4のヌクレオチド161から509、配列番号:55のヌクレオチド161-511、または配列番号:56のヌクレオチド1

6 1 - 5 1 1 に規定される配列と、約 8 0 % から 1 0 0 % またはそれらの間の任意の量の配列類似性を含むヌクレオチド配列を含む。当該配列は、開始コドンまたは開始部位を除去するように改変されてもよく、その結果、当該配列は、「a t g」コドンを含まない。さらに、不完全な M タンパク質の非限定例は、配列番号：1 - 4 のヌクレオチド 1 6 1 から 5 0 9、配列番号：5 5 のヌクレオチド 1 6 1 - 5 1 1、または配列番号：5 6 のヌクレオチド 1 6 1 - 5 1 1 を含む。本明細書に記載される使用のための天然型 C P M V R N A 2 配列（配列番号：5 5）への改変を含む配列の非限定例は、C P M V H T +、（配列番号：1）、および C P M V H T + [5 1 1]（配列番号：5 6）を含む。

【0040】

配列番号：5 5 は、ヌクレオチド 1 - 5 1 4 の C P M V R N A 2 ゲノムの天然型（野生型）配列のセグメント（W O 2 0 0 9 / 0 8 7 3 9 1 の表 1 に示される天然型 C P M V R N A - 2 ゲノムセグメントの全長配列；出典明示により本明細書に組み込まれる）を含む。配列番号：5 5 のヌクレオチド 1 - 5 1 1 由来の 5' U T R 配列は、1 1 5 および 1 6 1 位で開始する野生型「a t g」配列（イタリック太字）、およびヌクレオチド 1 6 1 - 5 1 1 由来の下線が引かれた不完全な M タンパク質（5 1 2 位の「a t g」はまた、文脈について示され；C P M V R N A - 2 の天然型 5' 領域の 5 1 2 位の「a t g」での開始は、9 5 K のポリプロテインの合成を生じる）：

【化 1】

```

1   tattaaaatc ttaatagggt ttgataaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaaccctc
61  ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct ctgtgttttc ttgcatgagc
121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttogg caccagtaca atgtttttctt tcaactgaagc
181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg tgtacttgtc
241 ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttget ggaggetget gtccagcccc
301 atacattact tggtacgatt ctgctgactt tcggcggtg caatatctct acttctgctt
361 gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
421 atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttga gaaagattgt
481 taagcttctg tatattctgc ccaaatttga aatg...

```

配列番号：5 5

を含む。

【0041】

C P M V R N A - 2 配列（配列番号：1 を参照されたい）のヌクレオチド 1 - 1 6 0 由来の 5' U T R は、第一のインフレーム開始開始コドン（1 6 1 位の）まで、転写開始部位で開始し、これは野生型コモウウイルスゲノムセグメントによりコードされる 2 つのカルボキシ共末端タンパク質の長い方の生産についての開始部位として機能する（2 つのコードされるタンパク質のうち短い方は 1 5 5 位で開始する）。さらに C P M V R N A - 2 ゲノム配列中の 1 1 5 位での（または対応する）“ 第三の ” 開始部位はまた、変異、欠失またはそうでなければ変更されてもよい。不完全な M タンパク質と組み合わせると、1 6 1 位の A U G の除去に加えて、A U G 1 1 5 の除去は、目的のヌクレオチド配列の発現を高めることが示されている（S a i n s b u r y a n d L o m o n o s s o f f , 2 0 0 8 , P l a n t P h y s i o l o g y ; 1 4 8 : 1 2 1 2 - 1 2 1 8 ; W O 2 0 0 9 / 0 8 7 3 9 1 ; 出典明示により本明細書に組み込まれる）。

【0042】

発現エンハンサーは、配列番号：1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 5 0 9、配列番

10

20

30

40

50

号：55のヌクレオチド1-511、または配列番号：56のヌクレオチド1-511を含んでもよく、かつ不完全なMタンパク質、ならびにスタッファースタッフアフラグメント、および任意にマルチブルクローニングサイトの3'末端の植物コザック配列を含むスタッファースタッフアフラグメントに融合されたCPMV 5'非翻訳領域(UTR)、または配列番号：1のヌクレオチド1-160、配列番号：1のヌクレオチド161-509、配列番号：1のヌクレオチド1-509、配列番号：55のヌクレオチド1-511、または配列番号：56のヌクレオチド1-511と、80%から100%まで、またはそれらの間の任意の量の配列類似性を含み、かつ不完全なMタンパク質を含むスタッファースタッフアフラグメント含み、かつスタッファースタッフアフラグメントおよび任意のマルチ-クローニング部位の3'末端で、植物コザック配列またはMタンパク質-天然コザック配列のいずれかの、植物において活性なコザック配列をさらに含み、かつ従来技術「CPMV HT」エンハンサー配列に作動可能に連結される異種のオープンリーディングフレームをコードする同一のヌクレオチド配列の発現と比較する場合、発現エンハンサーに作動可能に連結される異種のオープンリーディングフレームをコードするヌクレオチド配列の発現を高める特性を示す、配列を含む(配列番号：2；Sainsbury F., and Lomonossoff G. P., 2008, Plant Physiol. 148: pp. 1212-1218；出典明示により本明細書に組み込まれる)。

【0043】

スタッファースタッフア配列は、不完全なMタンパク質の約50から351ヌクレオチド、またはそれらの間の任意の量、例えば配列番号：1のヌクレオチド161-509または配列番号：55または56のヌクレオチド161-511であるがこれらに限定されない、スタッファースタッフアフラグメントの3'末端に位置する植物コザック配列もしくはMタンパク質-天然コザック配列、ならびに不完全なMタンパク質をコードする配列とコザック配列、例えば植物コザック配列の間に位置する、長さが約0から100ヌクレオチド、もしくはそれらの間の任意の量のマルチブルクローニングサイト(MCS)を含んでもよい。従ってスタッファースタッフア配列は、CPMV 5'UTR配列の3'末端に融合された、約50から約500、またはそれらの間の任意の量のヌクレオチド長のものであってもよく、例えばスタッファースタッフア配列は、CPMV 5'UTR配列の3'末端に融合された、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500ヌクレオチド、またはそれらの間の任意の量の長さのものであってもよい。

【0044】

発現エンハンサーは、植物発現系に目的のヌクレオチドの挿入を促進するために、1つ以上の「制限酵素部位」もしくは「制限酵素認識部位」、「マルチブルクローニングサイト」、「MCS」、「クローニング部位」、「ポリリンカー配列」または「ポリリンカー」をさらに含んでもよい。制限酵素部位は、当該技術分野でよく知られる制限酵素により認識される特異的な配列モチーフである。発現エンハンサーは、不完全なMタンパク質の下流(3')に位置する1つ以上の制限酵素部位またはクローニング部位を含んでもよい。1つ以上の制限酵素部位またはクローニング部位は、1つ以上のコザック配列の上流(5')に位置してもよく、かつ不完全なMタンパク質とコザック配列の間に位置する。ポリリンカー配列(マルチブルクローニングサイト)は、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸配列を5'UTRの3'末端に付加および除去するために有用な核酸の任意の配列を含んでもよい。ポリリンカー配列は、4から約100の核酸、またはそれらの間の任意の量を含んでもよい。

【0045】

配列番号：1、3、4または56の配列に規定されるCPMV HT+発現エンハンサー(CPMV HT+[WT115]；CPMV HT+[511]を含む)は、本発明の発現エンハンサーの、限定と考えられるべきではない例である。配列番号：1、3、4または56に規定されるCPMV HT+、CPMV HT+[WT115]、またはC

10

20

30

40

50

PMV HT + [5 1 1] を含み、かつ発現エンハンサー配列と作動可能に関連する植物制御領域、ならびに発現エンハンサーの 3' 末端に融合された目的のヌクレオチド配列 (GOI; 3' UTR およびターミネーター配列を有する) をさらに含む発現カセットもしくはベクターもまた、本発明に含まれる。配列番号: 1、3、4 または 5 6 に規定される CPMV HT + 発現エンハンサーのバリエーションもまた、本発明に含まれる。

【0046】

もしエンハンサー配列が、エンハンサー配列の 3' 末端で、CPMV 5' UTR 配列、不完全な Mタンパク質、および植物において活性なコザック配列、例えば植物コザック配列を含むならば、エンハンサー配列は、「CPMV HT + エンハンサー配列」と呼ばれてもよく、ただし、従来技術「CPMV HT」エンハンサー配列 (配列番号: 2; Sainsbury F., and Lomonosoff G.P., 2008, Plant Physiol. 148: pp. 1212 - 1218; 出典明示により本明細書に組み込まれる) に作動可能に連結される異種のオープンリーディングフレームをコードする同一のヌクレオチド配列の発現と比較する場合、CPMV HT + エンハンサー配列が発現エンハンサーに作動可能に連結される異種のオープンリーディングフレームをコードするヌクレオチド配列の発現を高める特性を示すことを条件とする。

10

【0047】

CPMV HT + 中に存在してもよいバリエーションは、以下を含んでもよい:

1) 約 50 から約 351 ヌクレオチドまたはそれらの間の任意の量の不完全な Mタンパク質の長さの改変;

20

2) マルチブルクローニングサイト (MCS) における改変、含まれる配列と、長さ約 0 から約 100 のヌクレオチドまたはそれらの間の任意の長さの MCS の長さの両方; および

3) コザック配列は、植物において活性な任意のコザック配列であってもよく、かつ植物コザック配列または Mタンパク質 - 天然コザック配列を含んでもよい。

例えば、CPMV 5' UTR は、配列番号: 1 または 3 のヌクレオチド 1 から 160、または配列番号: 1 または 3 のヌクレオチド 1 - 160 と約 80% から約 100%、またはそれらの間の任意の量の配列類似性を含む。

【0048】

配列番号: 1 は、CPMV HT + を含む発現エンハンサーの例である (小文字、太字 およびイタリックで示される 115 位の改変 ATG (GTG) を含む、ヌクレオチド 1 - 160、5' UTR; 以下を含むスタッファーフラグメント: 下線が引かれた不完全な Mタンパク質、ヌクレオチド 161 - 509、162 位の改変ヌクレオチド (ACG) を有する; イタリックで示されるマルチブルクローニングサイト、ヌクレオチド 510 - 528; ならびに大文字および太字で示される植物コザック配列、ヌクレオチド 529 - 534):

30

【化 2】

1 tattaaaatc ttaatagggtt ttgataaaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaacccttc
 61 ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc ttgcgtgagc
 121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc
 181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg tgtacttgtc
 241 ctattcttgt cggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct gttcagcccc
 301 atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct acttctgctt
 361 gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
 421 atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttgga gaaagattgt
 481 taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt tcgggccccaa taccgcggAG AAAA

10

(配列番号：1)。

【0049】

構築物1819、1805、2319、2142、2146、1829、1875、2052、2062、1839および1860(実施例1、および4-13を参照されたい)は、配列番号：1を含むCPMV HT+発現エンハンサーを含む構築物の代表例である。これらの構築物を用いた結果は、図2および3に見出されうる。

20

【0050】

配列番号：2は、従来技術で知られる「CPMV HT」発現エンハンサー(例えばSainsbury and Lomonosoff 2008, Plant Physiol. 148: pp. 1212-1218の図1; 出典明示により本明細書に組み込まれる)を含む。CPMV HTは、115位の改変ヌクレオチド(cgt)を有する配列番号：2のヌクレオチド1-160由来の5'UTR配列、および162位の改変ヌクレオチド(acg)を有する不完全なMタンパク質を含み、かつ、植物コザック配列を欠く(5'UTR:ヌクレオチド1-160; 不完全なMタンパク質は下線が引かれ、ヌクレオチド161-509)。配列番号：2はまた、Sainsbury and Lomonosoff 2008により記載される従来技術のCPMV HT配列中に存在しないマルチプルクローニングサイト(イタリック、ヌクレオチド510-517)を含む：

30

【化 3】

1 tattaaaatc ttaatagggtt ttgataaaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaacccttc
 61 ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc ttgcgtgagc
 121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc
 181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg tgtacttgtc
 241 ctattcttgt cggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct gttcagcccc
 301 atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct acttctgctt
 361 gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
 421 atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttgga gaaagattgt
 481 taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt cgggccc

40

50

配列番号：2。

【0051】

C P M V H Tを含む構築物は、参照構築物として明細書中で示され、その結果、目的のヌクレオチド配列の発現レベル、またはC P M V H T +、C P M V H T + [W T 1 1 5]もしくはC P M V H T + [5 1 1]を含む構築物を用いて生産された目的のヌクレオチド配列によりコードされる産物が比較されてもよい。構築物1391、484、409、2140、2130、1039、1067、2072、2074、1445および1454（実施例1、および4-13を参照されたい）は、参照構築物C P M V H Tの代表例であり、かつ配列番号：2を含む。これらの構築物を用いる結果は、図2および3に見出されうる。

10

【0052】

本明細書に記載されるC P M V H T +の植物コザック配列は、任意の植物コザック配列であってもよく、配列番号：5-17の配列の1つを含むが、これらに限定されない（図4も参照されたい、植物コザックを有するC P M V H T +；図4の構築物は配列番号：1のヌクレオチド1-528、植物コザック配列のいくつかの例の1つを含み、かつ植物制御領域および目的のヌクレオチド配列：G O Iの転写開始部位A T Gを含む）。

【0053】

発現エンハンサーは、1つ以上の「コザックコンセンサス配列」または「コザック配列」をさらに含んでもよい。コザック配列は、植物において活性な任意のコザック配列、例えば、植物コザック配列（例えばC P M V H T +；C P M V H T W T 1 1 5）、または天然のMタンパク質内に存在するコザック配列（例えばC P M V H T + 5 1 1）を含んでもよい。コザック配列は、翻訳の開始において重要な役割を果たす。任意のm R N A不安定配列が、導入遺伝子構築物から排除されること、および、必要に応じ、翻訳開始部位（start site）または開始部位（initiation site）が、植物のためのコザックコンセンサスと一致することを確保することによって、翻訳の割合は最適化されうる（Gutierrez, R. A. et al., 1999, Trends Plant Sci. 4, 429-438; Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J., 2002, Curr. Opin. Plant Biol. 5, 460-465）。このモチーフにおいて最も高度に保存される位置は、A T Gコドンの3ヌクレオチド上流のプリン（最も頻繁にはA）であり、翻訳の開始を示す（Kozak, M., 1987, J. Mol. Biol. 20: 947-950、出典明示により本明細書に組み込まれる）。コザック配列は、不完全なMタンパク質内に存在する天然の配列を含んでもよい。例えば、配列番号：55または56に示される不完全なMタンパク質のヌクレオチド512からすぐ上流の配列、例えば配列番号：55のヌクレオチド508-511。

20

30

【0054】

植物コザックコンセンサス配列は、当技術分野で知られている（例えばRangan et al. Mol. Biotechnol., 2008, July 39(3), pp. 207-213を参照されたい）。本明細書に記載されるように、自然に存在するコザック配列および合成コザック配列の両方は発現エンハンサーにおいて使用されてもよく、または目的のヌクレオチド配列に融合されてもよい。

40

【0055】

植物コザック配列は、以下の植物コンセンサス配列を含むがこれらに限定されない、任意の知られた植物コザック配列であってもよい（例えばL. Rangan et al. Mol. Biotechnol. 2008を参照されたい）：

c a A (A / C) a (配列番号：5；植物界)
 a a A (A / C) a (配列番号：6；双子葉植物)
 a a (A / G) (A / C) a (配列番号：7；シロイヌナズナ)

植物コザック配列はまた：

A G A A A (配列番号：8)

50

A G A C A (配列番号： 9)
 A G G A A (配列番号： 10)
 A A A A A (配列番号： 11)
 A A A C A (配列番号： 12)
 A A G C A (配列番号： 13)
 A A G A A (配列番号： 14)
 A A A G A A (配列番号： 15)
 A A A G A A (配列番号： 16)
 (A / -) A (A / G) (A / G) (A / C) A . (配列番号： 17 ; コンセンサ配列)

10

の群から選択されてもよい(図4を参照されたい)。

【0056】

植物コザックコンセンサ配列を有するCPMV HT+は、配列番号：4に提供される(小文字、太字およびイタリックで示される115位の改変ATG(GTG))を含む、ヌクレオチド1-160、5'UTR;以下を含むスタッパーフラグメント:下線が引かれた不完全なMタンパク質、ヌクレオチド161-509、162位の改変ヌクレオチド(ACG)を有する;イタリックで示されるマルチブルクローニングサイト、ヌクレオチド510-528;ならびに大文字および太字で示されるコンセンサ植物コザック配列、ヌクレオチド529-534)。

【化4】

20

```

1  tattaaaatc ttaatagggt ttgataaaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaacccttc
61  ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtcttct ttgcgtgagc
121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc
181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg tgtacttgtc
241 ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggtgct gttcagcccc
301 atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcggttg caatatctct acttctgctt
361 gacgaggtat tgttgctgtt acttcttctt tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
421 atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttgga gaaagattgt
481 taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt tcgggccccaa taccgctg(A/-)A(A/G)
      (A/G) (A/C)A
  
```

30

(配列番号： 4)

【0057】

40

配列番号：56(「CPMV HT+[511]」)は、ヌクレオチド1-154由来のCPMV RNA2ゲノムの天然の配列のセグメントを含む。配列番号：56のヌクレオチド1-511由来の5'UTR配列は、115位(「a」の代わりに「g」;イタリック太字で示される)および162位で(「t」の代わりに「c」;イタリック太字で示される)改変「atg」配列を、ならびにヌクレオチド161-511由来の不完全なMタンパク質(下線が引かれる)を含む。CPMV HT+[511]は、天然のMタンパク質コザックコンセンサ配列(ヌクレオチド508-511;太字)を含む:

【化 5】

1 tattaaaatc ttaatagggtt ttgataaaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaacccttc
 61 ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaactttctct cttgtctttc ttgc**gtg**gagc
 121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc
 181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg tgtacttgtc
 241 ctattcttgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttget ggaggttget gttcagcccc
 301 atacattact tgtaacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct acttctgctt
 361 gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
 421 atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttga gaaagattgt
 481 taagcttctg tatattctgc ccaaatt**tga** a...

10

配列番号：5 6

【0 0 5 8】

構築物 1 9 5 2 - 1 9 5 9 は、バリエーション植物コザック配列を有する、配列番号：1 を含む C P M V H T + 発現エンハンサーの例である（実施例 3、ならびに図 4 および 7 を参照されたい）。

20

【0 0 5 9】

C P M V H T + エンハンサー配列の別の非限定例は、配列番号：3 の配列により提供される（C P M V H T + [W T 1 1 5] ）。C P M V H T + を含み、かつ配列番号：3 の発現エンハンサー配列と作動可能に関連する植物制御領域、および 3 ' 末端で目的のヌクレオチド配列（G O I ）に融合された転写開始部位（A T G ）を含む、発現カセットもしくはベクターもまた、本発明の一部である。

【0 0 6 0】

配列番号：3（C P M V H T + [W T 1 1 5] ）は、小文字、太字で示される、1 1 5 - 1 1 7 位の A T G を有する、ヌクレオチド 1 - 1 6 0、5 ' U T R、以下を含むスタッファーフラグメント：下線が引かれた不完全な M タンパク質、ヌクレオチド 1 6 1 - 5 0 9、小文字、太字、および下線が引かれた 1 6 1 - 1 6 3 位の改変 A T G（a c g）を有する、イタリックで示されるマルチプルクローニングサイト、ヌクレオチド 5 1 0 - 5 2 8；ならびに大文字および太字で示される植物コザック配列、ヌクレオチド 5 2 9 - 5 3 4 を含む。

30

【化 6】

1 tattaaaatc ttaataggtt ttgataaaag cgaacgtggg gaaacccgaa ccaaacccttc
 61 ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct cttgtctttc ttgcatgagc
 121 gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc
 181 gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgccgcgcca ttaaataacg tgtactttgc
 241 ctattcttgt cggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct gttcagcccc
 301 atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct acttctgctt
 361 gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt tctataagaa
 421 atctagtatt ttctttgaaa cagagttttc ccgtggtttt cgaacttgga gaaagattgt
 481 taagcttctg tatattctgc ccaaatttgt tcgggccccaa taccgcggAG AAAA

10

(配列番号 : 3)

【 0 0 6 1】

配列番号 : 3 の植物コザック配列は、配列番号 : 5 - 17 の配列の 1 つを含むが、これらに限定されない、任意の植物コザック配列であってもよい (図 4、植物コザックを有する CPMV HT + も参照されたい ; 図 4 の構築物は、配列番号 : 1 のヌクレオチド 1 - 528、植物コザック配列のいくつかの例の 1 つを含み、かつ植物制御領域および目的のヌクレオチド配列 : GOI の転写開始部位 ATG を含む)。

20

【 0 0 6 2】

CPMV HT + 発現エンハンサーは、配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 160、配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 161 - 509、または配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 509 に規定される配列と少なくとも 100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、および 80% の同一性を有してもよい。例えばエンハンサー配列は、配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 160、配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 161 - 509、または配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 509 に規定される配列と約 80% から約 100% まで、またはそれらの間の任意の量の同一性を有してもよく、または配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 160、配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 161 - 509、または配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 509 に規定される配列と約 90% から約 100% まで、またはそれらの間の任意の量の同一性を有してもよく、または配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 160、配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 161 - 509、または配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 509 に規定される配列と約 95% から約 100% まで、またはそれらの間の任意の量の同一性を有してもよく、ここで、発現エンハンサーは、本明細書に記載される植物制御領域および植物コザック配列に作動可能に連結される場合に、同一の植物制御領域を用いて CPMV HT (配列番号 : 2) に融合された目的のヌクレオチド配列の発現レベルと比較される場合、発現エンハンサーに作動可能に連結された目的のヌクレオチド配列の発現レベルを増加させる。

30

40

【 0 0 6 3】

特定の配列に言及する場合の用語「パーセントの類似性」、または「パーセントの同一性」は、例えばウィスコンシン大学 GCG ソフトウェアプログラムに記載されるように、またはマニュアルアラインメントおよび外観検査によって、使用される (例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., 1995 補足を参照されたい)。比較のための配列のア

50

ラインメントの方法は、当技術分野でよく知られている。比較のための配列の最適なアラインメントは例えば、Smith & Waterman のアルゴリズム (1981, Adv. Appl. Math. 2: 482) を用いて、Needleman & Wunsch のアラインメントアルゴリズムによって (1970, J. Mol. Biol. 48: 443)、Pearson & Lipman の類似性方法のための研究によって (1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444)、これらのアルゴリズムのコンピューター化される実装によって (例えば: Wisconsin Genetic Software Package, Genetics Computer Group (GCG) in GAP、BESTFIT、FASTA、および TFasta、575 Science Dr., Madison, Wis.) 実行できる。

10

【0064】

パーセントの配列同一性および配列類似性を決定するために適切なアルゴリズムの例は、BLAST および BLAST 2.0 アルゴリズムであり、それは Altschul et al., (1977, Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402) および Altschul et al., (1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410) にそれぞれ記載される。本発明の核酸およびタンパク質に対するパーセントの配列同一性を決定するために、BLAST および BLAST 2.0 は本明細書に記載されるパラメーターを用いて使用される。例えば BLASTN プログラム (ヌクレオチド配列用) は、11 のワード長 (W)、10 の期待値 (E)、M = 5、N = -4 および両鎖の比較をデフォルトとして使用してもよい。アミノ酸配列について、BLASTP プログラムは、3 のワード長、および 10 の期待値 (E)、および BLOSUM62 スコアリングマトリックス (scoring matrix) (Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 を参照されたい) 50 のアラインメント (B)、10 の期待値 (E)、M = 5、N = -4、および両鎖の比較をデフォルトとして使用してもよい。BLAST 解析を実行するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センターを通じて利用可能である (URL: ncbi.nlm.nih.gov/ を参照されたい)。

20

【0065】

図 2 - 4 に示されるように、本明細書に記載される発現エンハンサーの使用は、同一のプロモーター、3' UTR およびターミネーター配列を用いて、かつ従来技術の発現エンハンサーに作動可能に連結された、同一の目的のヌクレオチド配列の発現と比較する場合、一般に目的のヌクレオチド配列の発現の増加をもたらした。例えば、図 2 および 3 を参照すると：

30

H1 A / California / 07 / 2009 (「PDI - H1 Cal」、または「H1 A / California / 07 / 2009」) : CPMV HT + ベースの構築物番号 1805、CPMV HT ベースの構築物番号 484 (実施例 4 を参照されたい) ;

H3 A / Victoria / 361 / 2011 (「PDI - H3 Vic」、または「H3 A / Victoria / 361 / 2011」) : CPMV HT + ベースの構築物番号 1819 ; CPMV HT ベースの構築物番号 1391 (それぞれ実施例 1 および 2 を参照されたい) ;

40

欠失タンパク質分解ループを有し、かつ天然シグナルペプチドを有する B / Wisconsin / 1 / 2010 (「WtSp - B Wis - PrL」、または「B / Wisconsin / 1 / 2010」) : CPMV HT + ベースの構築物番号 1839 ; CPMV HT ベースの構築物番号 1445 (実施例 12 を参照されたい) ;

欠失タンパク質分解ループを有し、かつ PDI シグナルペプチドを有する B Brisbane / 60 / 08 (「B Brisbane / 60 / 08」) : CPMV HT + ベースの構築物番号 1829 ; CPMV HT ベースの構築物番号 1039 (実施例 8 を参照されたい) ;

B Brisbane / 60 / 08 + H1 Tm、膜貫通ドメインおよび細胞質側末

50

端に融合された欠失タンパク質分解ループを有し、かつPDIシグナルペプチドを有する
(「B Brisbane/60/08+H1Tm」):CPMV HT+ベースの構築物番号1875;CPMV HTベースの構築物1067(実施例9を参照されたい)、

欠失タンパク質分解ループを有し、かつPDIシグナルペプチドを有するB Massachusetts/2/2012 2012(「B Massachusetts/2/2012 2012」):CPMV HT+ベースの構築物番号2052;CPMV HTベースの構築物番号2072(実施例10を参照されたい)、

膜貫通ドメインおよび細胞質側末端に融合された欠失タンパク質分解ループを有し、かつPDIシグナルペプチドを有するB Massachusetts/2/2012 +H1Tm(「B Massachusetts/2/2012+H1Tm」):CPMV HT+ベースの構築物番号2062;CPMV HTベースの構築物2074(実施例11を参照されたい)、

10

膜貫通ドメインおよび細胞質側末端に融合された欠失タンパク質分解ループを有し、かつ天然シグナルペプチドを有するB Wisconsin/1/2010+H1Tm(「B Wisconsin/1/2010+H1Tm」):CPMV HT+ベースの構築物番号1860;CPMV HTベースの構築物1454(実施例13を参照されたい);

PDIシグナルペプチドを有するインフルエンザA/Indonesia/5/2005由来のH5(PDI H5 Indo):CPMV HT+ベースの構築物番号2319;CPMV HTベースの構築物番号409(実施例5を参照されたい);

20

天然シグナルペプチドが、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのものにより置換されているインフルエンザA/Hangzhou/1/2013由来のH7(H7 Han):CPMV HT+ベースの構築物番号2142;CPMV HTベースの構築物番号2140(実施例6を参照されたい)

インフルエンザA/Indonesia/5/2005由来のH5の膜貫通ドメインおよび細胞質側末端(TMCT)に融合され、かつアルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのシグナルペプチドを有する、インフルエンザA/Hangzhou/1/2013由来のH7(H7 Han+H5Tm):CPMV HT+ベースの構築物番号2146;CPMV HTベースの構築物番号2130(実施例7を参照されたい)と作動可能に連結される、CPMV-HT(従来技術)発現構築物およびCPMV HT+ベースの発現構築物を含む植物において生産されるタンパク質の発現の比較が示される。

30

【0066】

一般に、発現(血液凝集活性として決定される)は、従来技術のCPMV HTベースの構築物に関するものと比較する場合、CPMV HT+ベースの構築物において増加する。

【0067】

さらに、目的のヌクレオチド配列のいくつかは、例えば異種のシグナルペプチド(例えばPDI)、異種の膜貫通ドメイン細胞質側末端配列(TDCT)、および/または欠失タンパク質分解ループ(PrL-)を含む改変配列を含む、キメラタンパク質または改変タンパク質をコードし、かつ活性における増加をさらに観察した。

40

【0068】

もし、上述のCPMV HT+ベースの構築物において使用される植物コザック配列が、他の植物コザック配列、例えば、配列番号:8-16において定義されるそれらの植物コザック配列の1つと置き換わっていれば、CPMV HT+ベースの構築物を用いて観察される発現の増加もまた、観察される。例えば、図4を参照すると、種々の植物コザック配列にそれぞれ融合される目的のヌクレオチド配列(H3 A/Victoria/361)と作動可能に連結されるCPMV HT+ベースの発現構築物を含む植物において生産されるタンパク質の発現の比較が示されている。それぞれの場合において、CPMV HT+ベースの構築物による発現(血液凝集力価として決定される)は、顕著な発現レ

50

ベル、かつ従来技術の C P M V H T ベースの構築物より大きいことを実証する。

【 0 0 6 9 】

タンパク質をコードする目的のヌクレオチド配列は、発現される遺伝子上流に位置する「翻訳開始部位 (translation initiation site) 」もしくは「開始部位 (initiation site) 」または「翻訳開始部位 (translation start site) 」もしくは「開始部位 (start site) 」または「開始コドン」の存在を必要とする。かかる開始部位が、エンハンサー配列の一部、または目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部のいずれかとして提供されてもよい。

【 0 0 7 0 】

「発現カセット」は、宿主細胞における目的の核酸の転写のための適切なプロモーターまたは他の制御エレメントの制御下で、およびそれらと作動可能に (operably) (もしくは作動可能に (operatively)) 連結される目的の核酸を含むヌクレオチド配列を指す。

【 0 0 7 1 】

「タンパク質分解ループ」または「開裂部位」は、前駆体 H A 0 開裂に伴うタンパク質分解部位のコンセンサス配列を意味する。本明細書に使用される「コンセンサス」または「コンセンサス配列」は、複数の配列のアラインメントの解析に基づく関連配列の配列可変性、例えば、特定のインフルエンザ H A 0 配列のサブタイプを含む配列 (アミノ酸またはヌクレオチド配列のいずれか) を意味する。インフルエンザ H A 0 開裂部位のコンセンサス配列は、例えばコンセンサス H 1、コンセンサス H 3、コンセンサス H 5 を含むインフルエンザ A コンセンサスヘマグルチニンアミノ酸配列、または例えば、 B F l o r i d a、B M a l a y s i a、B W i s c o n s i n および B M a s s a c h u s e t t s に限定されないインフルエンザ B コンセンサスヘマグルチニンアミノ酸配列を含んでもよい。タンパク質分解のループ領域の配列の非限定例は、米国仮出願番号 6 1 / 8 0 6 , 2 2 7 (2 0 1 3 年、3 月 2 8 出願、出典明示により本明細書に組み込まれる ; また B i a n c h i e t a l . , 2 0 0 5 , J o u r n a l O f V i r o l o g y , 7 9 : 7 3 8 0 - 7 3 8 8 を参照されたい ; 出典明示により本明細書に組み込まれる) の図 1 5 および 1 8 B において示される。

【 0 0 7 2 】

例えば点変異、置換、挿入、または欠失に限定されないが、タンパク質分解ループまたは開裂部位における残基はいずれかが変異されてもよい。本明細書で使用される用語「アミノ酸変異」または「アミノ酸改変」は、アミノ酸置換、欠失、挿入、および改変を包含することを意味する。最終的な構築物が、所望の特徴、例えば、減少されるもしくは消滅されるタンパク質分解ループの開裂またはプロテアーゼによる開裂部位を所有する限り、置換、欠失、挿入、および改変の任意の組み合わせは、米国仮出願番号 6 1 / 8 0 6 , 2 2 7 (2 0 1 3 年、3 月 2 8 出願、出典明示により本明細書に組み込まれる) に記載されるように、最終的な構築物に到達するよう作製されうる。

【 0 0 7 3 】

本明細書に記載されるように、目的のタンパク質をコードする目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結される発現エンハンサー配列を含む核酸構築物 (発現系) が提供される。本明細書に記載されるエンハンサー配列を含む植物発現系もまた、提供される。また、目的のタンパク質をコードする、目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結されるエンハンサー配列と作動可能に関連する植物制御領域を含む植物発現系が提供される。エンハンサー配列は、配列番号 : 1 もしくは 3、または配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 1 6 0、配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 6 1 - 5 0 9、または配列番号 : 1、3 もしくは 4 のヌクレオチド 1 - 5 0 9 と 1 0 0 %、9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 0 %、8 5 % または 8 0 % の同一性を示すヌクレオチド配列から選択されてもよく、ここで、発現エンハンサーが本明細書に記載される植物制御領域および植物コザック配列に作動可能に連結される場合に、同一の植物制御領域を用いて C P M V

10

20

30

40

50

HT (配列番号: 2; Sainsbury F., and Lomonosoff G. P., 2008, Plant Physiol. 148: pp. 1212 - 1218 に記載される不完全なMタンパク質を含む従来先行技術のエンハンサー配列; 出典明示により本明細書に組み込まれる) に融合された目的のヌクレオチド配列の発現レベルと比較される場合、発現エンハンサーに作動可能に連結される目的のヌクレオチド配列の発現レベルを増加させる。

【0074】

本発明のエンハンサー配列が、宿主生物、例えば植物における目的のタンパク質を発現するために使用されてもよい。この場合では、目的のタンパク質はまた、問題となっている宿主生物に異種であってもよく、かつ当技術分野で知られた形質転換技術を用いて植物細胞に導入されてもよい。生物における異種の遺伝子は、内在性等価遺伝子 (endogenous equivalent gene)、すなわち同一のもしくは類似の機能を正常に実行するもの、と置き換わってもよく、または挿入される配列は、内在性遺伝子もしくは他の配列に付加されてもよい。

【0075】

本発明はさらに、順番に、目的のヌクレオチド配列ならびに3' UTR配列およびターミネーター配列と融合される、本明細書に記載される発現エンハンサー配列に作動可能に連結される、プロモーターまたは植物制御領域を含む発現カセットを提供する。エンハンサー配列は、例えば、配列番号: 1、3および4、または配列番号: 1、3もしくは4のヌクレオチド1 - 160、配列番号: 1、3もしくは4のヌクレオチド161 - 509、または配列番号: 1、3もしくは4のヌクレオチド1 - 509と100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%または80%の同一性を示すヌクレオチド配列のいずれかが1つに定義されてもよいが、これらに限定されない。発現エンハンサーまたは目的のヌクレオチド配列のいずれかは、植物コザック配列を含んでもよい。

【0076】

当業者が理解するように、ターミネーション (ターミネーター) 配列は、植物宿主で活性な任意の配列であってもよく、例えばターミネーション配列は、二分節RNAウイルス、例えばコモウイルスのRNA - 2ゲノムセグメント由来であってもよく、またはターミネーション配列は、NOSターミネーターであってもよい。

【0077】

本発明の構築物は、3' 非翻訳領域 (UTR) をさらに含む。3' 非翻訳領域は、ポリアデニレーションシグナルおよびmRNAプロセッシングまたは遺伝子発現に影響を与えることができる任意の他の制御シグナルを含有する。ポリアデニレーションシグナルは通常、mRNA前駆体の3' 末端へのポリアデニル酸トラック (tracks) の付加に影響を与えることによって特徴付けられる。バリエーションは共通ではないが、ポリアデニレーションシグナルは、一般に標準型5' AATAAA - 3' への相同性の存在により認識される。適切な3' 領域の非限定例は、ノパリンシンターゼ (Nos遺伝子) などのアグロバクテリウム腫瘍誘導 (Ti) プラスミド遺伝子、およびダイズ貯蔵タンパク質遺伝子などの植物遺伝子、リブロース - 1, 5 - ニリン酸カルボキシラーゼ遺伝子の小サブユニット (ssRUBISCO; 米国4, 962, 028; 出典明示により本明細書に組み込まれる)、プラストシアニン発現を制御する際に使用されるプロモーター (Pwee and Gray 1993; 出典明示により本明細書に組み込まれる) のポリアデニレーションシグナルを含有する、3' 転写非翻訳領域である。ターミネーション (ターミネーター) 配列は、アルファルファプラストシアニン遺伝子の3' UTRから得られてもよい。

【0078】

「目的のヌクレオチド (もしくは核酸) 配列」、または「目的のコーディング領域」によって、目的のタンパク質を生産するための、宿主生物、例えば植物内で発現される任意のヌクレオチド配列、またはコーディング領域 (これらの用語は、互換的に使用されてもよい) が意味される。かかる目的のヌクレオチド配列は、限定されないが、天然もしくは

改変タンパク質、工業用酵素もしくは改変工業用酵素、農業用タンパク質もしくは改変農業用タンパク質、ヘルパータンパク質、タンパク質サプリメント、医薬活性タンパク質、栄養補助食品、付加価値のある生産物、または飼料、食品もしくは飼料および食品用途の両方のためのそれらのフラグメントをコードしてもよい。

【0079】

目的のタンパク質は、天然、または非天然シグナルペプチドを含んでもよく；非天然シグナルペプチドは、植物由来であってもよく、または動物性または細菌性のポリペプチドから得られてもよい。天然シグナルペプチドは、発現されている目的のタンパク質のシグナルペプチドに対応してもよく、さらに、シグナルペプチドは、インフルエンザ以外のウイルスの構造タンパク質またはヘマグルチニン由来であってもよい。使用されてもよいシグナルペプチドの非限定例は、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI SP; アクセション番号: Z11499のヌクレオチド32-103) のもの、またはパタチンシグナルペプチド (PatA SP; GenBank アクセション番号 A08215のヌクレオチド1738-1806に位置する) である。このアクセション番号についての PatA SP のヌクレオチド配列は:

ATGGCAACTACTAAACTTTTAAATTTTATTTTATGATATTAGCAACTACTAGTTCAACATGTGCT (配列番号: 57);

であり

パタチン Aシグナルペプチドのアミノ酸配列は:

MATTKTFLILFFMILATTSSTCA (配列番号: 58) である。

【0080】

目的のヌクレオチド配列、または目的のコーディング領域はまた、医薬活性タンパク質、例えば、予防接種もしくはワクチン接種等のため有用な、成長因子、成長調節因子、抗体、抗原、およびそれらのフラグメント、またはそれらの誘導体をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。かかるタンパク質は、ヒト病原体であるタンパク質、ウイルスタンパク質、例えば限定されないが呼吸器合胞体ウイルス (Respiratory syncytial virus) (RSV)、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、狂犬病ウイルス、ヒトパピローマウイルス (HPV)、エンテロウイルス71 (EV71) 由来の1つ以上のタンパク質、またはインターロイキン、例えば1つまたは1より多くのIL-1からIL-24、IL-26およびIL-27、サイトカイン、エリスロポエチン (EPO)、インスリン、G-CSF、GM-CSF、hPG-CSF、M-CSFもしくはそれらの組み合わせ、インターフェロン、例えば、インターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、インターフェロン-ガンマ、血液凝固因子、例えば、第VII因子、第IX因子、またはtPA、hGH、受容体、受容体アゴニスト、例えばRituxanを含むがこれに限定されない抗体、神経ポリペプチド、インスリン、ワクチン、例えば表皮成長因子、ケラチノサイト成長因子、形質転換成長因子に限定されない成長因子、成長調節因子、抗原、自己抗原、それらのフラグメント、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0081】

目的のタンパク質はまた、インフルエンザヘマグルチニンを含んでもよい (HA; 出典明示により本明細書に組み込まれるWO2009/009876を参照されたい)。HAは、シグナルペプチド、HA1ドメイン、および一般的にC-末端および小細胞質側末端で膜貫通アンカー部位を含むHA2ドメインを含むホモ三量体膜I型糖タンパク質である。HAをコードするヌクレオチド配列はよく知られており、かつ利用可能である (例えば、BioDefense and Public Health Database (Influenza Research Database; Squires et al., 2008 Nucleic Acids Research 36:D497-D503) URL: biohealthbase.org/GSearch/home.do?decorator=Influenza; または国立生物工学情報センター (National Center For Biotechnology Informati

10

20

30

40

50

on) (URL: ncbi.nlm.nih.govを参照されたい)によって維持されるデータベースを参照されたい。両方が出典明示により本明細書に組み込まれる)。

【0082】

HAタンパク質が、A型インフルエンザ、B型インフルエンザのものであってもよく、またはH1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、およびH16の群から選択されるA型インフルエンザHAのサブタイプであってよい。発明のいくつかの態様において、HAが、H1、H2、H3、H5、H6、H7およびH9群から選択されるA型インフルエンザ由来であってよい。上に列挙されたHAのフラグメントもまた、目的のタンパク質であると考えられてもよい。さらに、HAタイプまたは上に列挙されたサブタイプ由来のドメインが、キメラHAを生産するために組み合わせられてもよい(例えば出典明示により本明細書に組み込まれるWO2009/076778を参照されたい)。

10

【0083】

HAタンパク質を含むサブタイプの例は、A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/Indonesia/5/2006(H5N1)、A/chicken/New York/1995、A/herring gull/DE/677/88(H2N8)、A/Texas/32/2003、A/mallard/MN/33/00、A/duck/Shanghai/1/2000、A/northern pintail/TX/828189/02、A/Turkey/Ontario/6118/68(H8N4)、A/shoveler/Iran/G54/03、A/chicken/Germany/N/1949(H10N7)、A/duck/England/56(H11N6)、A/duck/Alberta/60/76(H12N5)、A/Gull/Maryland/704/77(H13N6)、A/Mallard/Gurjev/263/82、A/duck/Australia/341/83(H15N8)、A/black-headed gull/Sweden/5/99(H16N3)、B/Lee/40、C/Johannesburg/66、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)、A/Brisbane/59/2007(H1N1)、A/Solomon Islands 3/2006(H1N1)、A/Brisbane 10/2007(H3N2)、A/Wisconsin/67/2005(H3N2)、B/Malaysia/2506/2004、B/Florida/4/2006、A/Singapore/1/57(H2N2)、A/Anhui/1/2005(H5N1)、A/Vietnam/1194/2004(H5N1)、A/Teal/Hong Kong/W312/97(H6N1)、A/Equine/Prague/56(H7N7)、A/Hong Kong/1073/99(H9N2))を含む。

20

30

【0084】

HAタンパク質が、H1、H2、H3、H5、H6、H7またはH9サブタイプであってよい。例えば、H1タンパク質が、A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/Puerto Rico/8/34(H1N1)、A/Brisbane/59/2007(H1N1)、A/Solomon Islands 3/2006(H1N1)、A/California/04/2009(H1N1)またはA/California/07/2009(H1N1)株由来であってよい。H3タンパク質はまた、A/Brisbane 10/2007(H3N2)、A/Wisconsin/67/2005(H3N2)、A/Victoria/361/2011(H3N2)、A/Texas/50/2012(H3N2)、A/Hawaii/22/2012(H3N2)、A/New York/39/2012(H3N2)、またはA/Perth/16/2009(H3N2)株由来であってよい。本発明のさらなる態様において、H2タンパク質が、A/Singapore/1/57(H2N2)株由来であってよい。H5タンパク質が、A/Anhui/1/2005(H5N1)、A/Vietnam/1194/2004(H5N1)、またはA/Indonesia/5/2005株由来であってよい。本発明の態様において、H6タンパク質が、A/Teal/Hon

40

50

g K o n g / W 3 1 2 / 9 7 (H 6 N 1) 株由来であってもよい。H 7 タンパク質が、A / E q u i n e / P r a g u e / 5 6 (H 7 N 7) 株、またはH 7 A / H a n g z h o u / 1 / 2 0 1 3、A / A n h u i / 1 / 2 0 1 3 (H 7 N 9)、もしくはA / S h a n g h a i / 2 / 2 0 1 3 (H 7 N 9) 株由来であってもよい。本発明の態様において、H 9 タンパク質は、A / H o n g K o n g / 1 0 7 3 / 9 9 (H 9 N 2) 株由来である。本発明のさらなる態様において、H A タンパク質が、B / M a l a y s i a / 2 5 0 6 / 2 0 0 4、B / F l o r i d a / 4 / 2 0 0 6、B / B r i s b a n e / 6 0 / 0 8、B / M a s s a c h u s e t t s / 2 / 2 0 1 2 - 様ウイルス(山形系統)、またはB / W i s c o n s i n / 1 / 2 0 1 0 (山形系統)を含むB型ウイルスであってもよいインフルエンザウイルス由来であってもよい。H 1、H 2、H 3、H 5、H 6、H 7、H 9またはB サブタイプ由来のH A タンパク質のアミノ酸配列の非限定例は、W O 2 0 0 9 / 0 0 9 8 7 6、W O 2 0 0 9 / 0 7 6 7 7 8、W O 2 0 1 0 / 0 0 3 2 2 5 (出典明示により本明細書に組み込まれる)に記載される配列を含む。インフルエンザウイルスH A タンパク質は、H 5 I n d o n e s i a であってもよい。

【0085】

H A はまた、H A の天然膜貫通ドメインが異種の膜貫通ドメインと置き換わっている、キメラH A であってもよい。H A タンパク質の膜貫通ドメインは、高度に保存されている(例えばW O 2 0 1 0 / 1 4 8 5 1 1 の図1 C を参照されたい; 出典明示により本明細書に組み込まれる)。異種の膜貫通ドメインは、任意のH A 膜貫通ドメイン、例えば、限定されないが、H 1 C a l i f o r n i a、B / F l o r i d a / 4 / 2 0 0 6 (G e n B a n k アクセション番号: A C A 3 3 4 9 3 . 1)、B / M a l a y s i a / 2 5 0 6 / 2 0 0 4 (G e n B a n k アクセション番号: A B U 9 9 1 9 4 . 1)、H 1 / B r i (G e n B a n k アクセション番号: A D E 2 8 7 5 0 . 1)、H 1 A / S o l o m o n I s l a n d s / 3 / 2 0 0 6 (G e n B a n k アクセション番号: A B U 9 9 1 0 9 . 1)、H 1 / N C (G e n B a n k アクセション番号: A A P 3 4 3 2 4 . 1)、H 2 A / S i n g a p o r e / 1 / 1 9 5 7 (G e n B a n k アクセション番号: A A A 6 4 3 6 6 . 1)、H 3 A / B r i s b a n e / 1 0 / 2 0 0 7 (G e n B a n k アクセション番号: A C I 2 6 3 1 8 . 1)、H 3 A / W i s c o n s i n / 6 7 / 2 0 0 5 (G e n B a n k アクセション番号: A B O 3 7 5 9 9 . 1)、H 5 A / A n h u i / 1 / 2 0 0 5 (G e n B a n k アクセション番号: A B D 2 8 1 8 0 . 1)、H 5 A / V i e t n a m / 1 1 9 4 / 2 0 0 4 (G e n B a n k アクセション番号: A C R 4 8 8 7 4 . 1)、H 5 - I n d o (G e n B a n k アクセション番号: A B W 0 6 1 0 8 . 1) 由来の膜貫通ドメインから得られてもよい。膜貫通ドメインはまた、以下のコンセンサスアミノ酸配列:

i L X i Y y s t v A i S s l X l X X m l a g X s X w m c s (配列番号: 59) によって定義されてもよい。

【0086】

異種の膜貫通ドメインを有するキメラH A を含む構築物の例は、以下を含む: 構築物番号1875 (H 1 A / C a l i f o r n i a / 0 7 / 2 0 0 9 により置換されている膜貫通ドメインおよび細胞質側末端を有するB B r i s b a n e / 6 0 / 0 8 + H 1 T M ; 実施例9を参照されたい)、構築物番号2074 (H 1 A / C a l i f o r n i a / 0 7 / 2 0 0 9 のものによって置換された膜貫通ドメインおよび細胞質側末端を有するB M a s s a c h u s e t t s / 2 / 2 0 1 2 + H 1 T m ; 実施例11を参照されたい)、および構築物番号1860 (H 1 A / C a l i f o r n i a / 0 7 / 2 0 0 9 のものによって置換された膜貫通ドメインおよび細胞質側末端を有するB W i s c o n s i n / 1 / 2 0 1 0 + H 1 T m ; 実施例13を参照されたい)。これらのキメラH A の活性は、図2に示される。

【0087】

本明細書で規定される発現エンハンサーはまた、1つまたは1より多くの目的のタンパク質をコードする、任意の目的のヌクレオチド配列の発現を駆動するために使用してもよ

10

20

30

40

50

い。タンパク質の例は、例えば、限定されないが、工業用酵素、例えばセルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、ペルオキシダーゼ、スブチリシン、タンパク質サプリメント、栄養補助食品、付加価値のある生産物、または飼料、食品もしくは飼料および食品用途の両方のためのそれらのフラグメント、医薬活性タンパク質、例えば、限定されないが、成長因子、成長調節因子、抗体、抗原、および予防接種もしくはワクチン接種等のため有用なそれらのフラグメントまたはそれらの誘導体、を含む。さらなる目的のタンパク質は、インターロイキン、例えばIL-1からIL-24、IL-26およびIL-27の1つまたは1より多く、サイトカイン、エリスロポエチン(EPO)、インスリン、G-CSF、GM-CSF、hPG-CSF、M-CSFまたはそれらの組み合わせ、インターフェロン、例えば、インターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、インターフェロン-ガンマ、血液凝固因子、例えば、第VII因子、第IX因子、またはtPA、hGH、受容体、受容体アゴニスト、抗体、神経ポリペプチド、インスリン、ワクチン、成長因子、例えば、限定されないが、上皮成長因子、ケラチノサイト成長因子、形質転換成長因子、成長調節物質、抗原、自己抗原、それらのフラグメント、抗体、モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、一本鎖モノクローナル抗体、ウイルス様粒子(VLP)、またはそれらの組み合わせを含んでもよいが、これらに限定されない。

【0088】

目的のタンパク質がVLPであるならば、VLPは、HA0前駆体型、またはジスルフィド架橋形態により共に保持されるHA1もしくはHA2ドメインを含んでもよい。VLPは、約20nmから1μm、またはそれらの間の任意の量、例えば60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、120、130、140、150、160、170、180、190もしくは200nm、またはそれらの間の任意の量、例えば100nmの平均サイズを有してもよく、かつ、脂質膜を含んでもよい。VLPは、エンベロープまたは非エンベロープ、例えば、ウイルス外被タンパク質、ウイルス構造タンパク質、ウイルス性カプシドタンパク質、またはウイルスコートタンパク質であってもよい。VLPは、1つ以上の脂質、リン脂質、核酸、膜等をさらに含んでもよい。

【0089】

HAは、天然または非天然シグナルペプチドを含んでもよく；非天然シグナルペプチドは、植物由来であってもよい。例えば、シグナルペプチドは、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼシグナルペプチド(PDI)であってもよい。天然シグナルペプチドは、発現されたヘマグルチニンのものに対応してもよく、または第二のヘマグルチニンに対応してもよい。

【0090】

本発明はまた、HAタンパク質をコードする配列を含む核酸分子を提供する。核酸分子はHAタンパク質をコードする配列に作動可能に連結された1つ以上の制御領域をさらに含んでもよい。核酸分子が、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16またはB型インフルエンザ由来のHAをコードする配列を含んでもよい。例えば、当該核酸分子によりコードされるHAタンパク質が、H1、H2、H3、H5、H6、H7、H9サブタイプ、B型由来のHAであってもよい。当該核酸によりコードされるH1タンパク質が、A/New Cal edonia / 20 / 99 (H1N1)、A / Puerto Rico / 8 / 34 (H1N1)、A / Brisbane / 59 / 2007 (H1N1)、A / Solomon Islands / 3 / 2006 (H1N1)、A / California / 04 / 2009 (H1N1) または A / California / 07 / 2009 (H1N1) 株由来であってもよい。当該核酸分子によりコードされるH3タンパク質が、A / Brisbane / 10 / 2007 (H3N2)、A / Wisconsin / 67 / 2005 (H3N2)、A / Victoria / 361 / 2011 (H3N2)、A / Texas / 50 / 2012 (H3N2)、A / Hawaii / 22 / 2012 (H3N2)、A / New York / 39 / 2012 (H3N2)、または A / Perth / 16 / 2009 (H3N2) 株由来であってもよい。当該核酸分子によりコードされるH2タンパク質が、A / Sin

gapore / 1 / 57 (H2N2) 株由来であってもよい。当該核酸分子によりコードされるH5タンパク質が、A / Anhui / 1 / 2005 (H5N1)、A / Vietnam / 1194 / 2004 (H5N1)、またはA / Indonesia / 5 / 2005 株由来であってもよい。当該核酸分子によりコードされるH6タンパク質が、A / Teal / Hong Kong / W312 / 97 (H6N1) 株由来であってもよい。当該核酸分子によりコードされるH7タンパク質が、A / Equine / Prague / 56 (H7N7) 株、またはH7A / Hangzhou / 1 / 2013、A / Anhui / 1 / 2013 (H7N9)、もしくはA / Shanghai / 2 / 2013 (H7N9) 株由来であってもよい。さらに、当該核酸分子によりコードされるH9タンパク質が、A / Hong Kong / 1073 / 99 (H9N2) 株由来であってもよい。当該核酸分子によりコードされるHAタンパク質が、B / Malaysia / 2506 / 2004、B / Florida / 4 / 2006、B / Brisbane / 60 / 08、B / Massachusetts / 2 / 2012 - 様ウイルス (山形系統)、またはB / Wisconsin / 1 / 2010 (山形系統) を含むB型ウイルスインフルエンザウイルス由来であってもよい。H1、H2、H3、H5、H6、H7、H9またはBサブタイプ由来のHAタンパク質のアミノ酸配列の非限定例は、WO2009 / 009876、WO2009 / 076778、WO2010 / 003225 (出典明示により本明細書に組み込まれる) に記載される配列を含む。インフルエンザウイルスHAタンパク質は、H5 Indonesia であってもよい。

10

【0091】

20

表1：本明細書に記載される調製された構築物の例：

【表 1 - 1】

CPMV-HTベースの構築物 (配列番号: 2 ; 従来技術を含む構築物)

構築物 #	SP ₁	目的の配列	例
1391	PD I ²	H3 Victoria	1
484	PD I	H1 California	4
409	PD I	H5 Indonesia	5
2140	PD I	H7 Hangzhou	6
2130	PD I	H7 Hangzhou+H5 Indonesia TMCT ⁴	7
1039	PD I	B Brisbane (PrL-)	8
1067	PD I	B Brisbane (PrL-) +Hi California TMCT	9
2072	PD I	B Massachusetts (PrL-)	10
2074	PD I	B Massachusetts (PrL-) +H1 California TMCT	11
1445	WT ₃	B Wisconsin (PrL-)	12
1454	WT	B Wisconsin (PrL-) +H1 California TMCT	13

10

20

30

【表 1 - 2】

CPMV HT+ベースの構築物（配列番号：1を含む構築物）

構築物 #	SP	目的の配列	例
1819	PD I	H3 Victoria	2
1805	PD I	H1 California	4
2319	WT	H5 Indonesia	5
2142	PD I	H7 Hangzhou	6
2146	PD I	H7 Hangzhou+ H5 Indonesia TMCT	7
1829	PD I	B Brisbane (Pr1-)	8
1875	PD I	B Brisbane (PrL-) +H1 California TMCT	9
2052	PD I	B Massachusetts (PrL-)	10
2062	PD I	B Massachusetts (PrL-)+H1 California TMCT	11
1839	WT	B Wisconsin (PrL-)	12
1860	WT	B Wisconsin (PrL-)+H1 California TMCT	13

1 : SP - シグナルペプチド

2 : PDI - アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ

3 : WT - 野生型または天然

4 : TMCT - 膜貫通ドメインおよび細胞質側末端

【0092】

もし目的の核酸配列が、直接的にまたは間接的に植物に毒性な生産物をコードするならば、かかる毒性が、所望の組織内または所望の植物発達の段階で、目的のヌクレオチド配列を選択的に発現させることによって減少されてもよい。

【0093】

本発明のヌクレオチド配列、または核酸分子、または遺伝的構築物、またはベクターで形質転換されている、またはこれらを含んでいる、任意の適切な植物宿主において、目的のコーディング領域または目的のヌクレオチド配列が発現されてもよい。適切な宿主の例は、シロイヌナズナ、例えばキャノーラ、アブラナ属、トウモロコシ (maize)、タバコ属 (タバコ)、例えば、ニコチアナ・ベンサミアナ (Nicotiana benthamiana)、アルファルファ、ジャガイモ、サツマイモ (Ipomoea batatas)、ニンジン (ginseng)、エンドウ、オートムギ、コメ、ダイズ、コムギ、オオムギ、ヒマワリ、ワタ、コーン (corn)、ライムギ (Secale cereale)、ソルガム (Sorghum bicolor、Sorghum vulgare)、ペニバナ (Carthamus tinctorius) を含む農作物を含むが、これらに限定されない。

【0094】

本明細書に使用される用語「バイオマス」および「植物物質」は、植物由来の任意の物質を指す。バイオマスまたは植物物質は、植物全体、または葉、根、茎、花、種子を含む

植物の部分を含んでもよく、それはまた、植物の任意の組織、植物の任意の細胞、または植物の任意の画分、植物、組織もしくは細胞の部分を含んでもよい。さらに、バイオマスまたは植物物質は、細胞内の植物構成要素、細胞外の植物構成要素、植物の液体もしくは固体抽出物、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。さらに、バイオマスまたは植物物質は、植物の葉、茎、果実、根またはそれらの組み合わせ由来の、植物、植物細胞、組織、液体抽出物、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。植物の一部が、植物物質またはバイオマスを含んでもよい。

【 0 0 9 5 】

「制御領域」「制御エレメント」または「プロモーター」によって、典型的に、常にはないが、遺伝子のタンパク質コーディング領域の上流の核酸の部分が意味され、それは DNA もしくは RNA のいずれか、または DNA および RNA の両方を含んでもよい。制御領域が活性であり、かつ目的の遺伝子と作動可能に関連する、もしくは目的の遺伝子と作動可能に連結される場合、これは、目的の遺伝子の発現という結果をもたらす。制御エレメントが、器官特異性を媒介することができ、または発達もしくは一時的な遺伝子活性化を制御することができてもよい。「制御領域」は、プロモーターエレメント、基本的なプロモーター活性を示すコアプロモーターエレメント、外部刺激に反応して誘導性であるエレメント、負の制御エレメントなどのプロモーター活性を媒介するエレメントまたは転写エンハンサーを含む。本明細書で使用されるように「制御領域」はまた、転写後に活性なエレメント、例えば、翻訳および転写エンハンサー、翻訳および転写リプレッサーなどの遺伝子発現を調節する制御エレメント、上流活性化配列、ならびに mRNA 不安定性決定因子、を含む。これらの後者のエレメントのいくつかは、コーディング領域の近位に位置してもよい。

【 0 0 9 6 】

この開示の文脈において、用語「制御エレメント」または「制御領域」は、常にはないが、通常、構造的な遺伝子のコーディング配列の上流 (5 ') の DNA の配列を典型的に指し、それは、特定の部位で開始する転写のために必要とされる RNA ポリメラーゼおよび/または他の因子のための認識を提供することによってコーディング領域の発現を制御する。しかしながら、イントロン内に位置する、または配列の 3 ' の他のヌクレオチド配列もまた、目的のコーディング領域の発現の制御に貢献することが理解されるだろう。特定の部位での開始を保証する、RNA ポリメラーゼまたは他の転写因子のための認識を提供する制御エレメントの例は、プロモーターエレメントである。全てではないが、ほとんどの真核生物のプロモーターエレメントは、T A T A ボックス、転写開始部位のおよそ 2 5 塩基対上流に通常位置するアデノシンおよびチミジンヌクレオチド塩基対を含む保存された核酸配列を含有する。プロモーターエレメントは、転写の開始を担う基本的なプロモーターエレメント、並びに遺伝子発現を改変する他の制御エレメント (上に列挙されたような) を含んでもよい。

【 0 0 9 7 】

発生制御される、誘導性の、または構造的なものを含む、いくつかのタイプの制御領域が存在する。発生制御される、またはその制御下で遺伝子の差次的発現を制御する制御領域は、特定の器官もしくは器官の組織内で、その器官もしくは組織の発達の間の特定の時点で活性化される。しかしながら、発生制御されるいくつかの制御領域が、特定の発達段階で特定の器官または組織内で優先的に活性であってもよく、それらはまた、発生制御される方法で活性であってもよく、または同様に植物内の他の器官もしくは組織において基本的なレベルであってもよい。組織特異的な制御領域の例、例えば、種子特異的な制御領域は、ナピンプロモーターおよびクルシフェリンプロモーターを含む (R a s k e t a l . , 1 9 9 8 , J . P l a n t P h y s i o l . 1 5 2 : 5 9 5 - 5 9 9 ; B i l o d e a u e t a l . , 1 9 9 4 , P l a n t C e l l 1 4 : 1 2 5 - 1 3 0) 。葉特異的なプロモーターの例は、プラストシアニンプロモーターを含む (米国 7 , 1 2 5 , 9 7 8 を参照されたい、出典明示により本明細書に組み込まれる) 。

【 0 0 9 8 】

誘導性制御領域は、誘導物質に反応して1つ以上のDNA配列または遺伝子の転写を、直接的にまたは間接的に活性化することが可能なものである。誘導物質の不在下では、DNA配列または遺伝子は、転写されないだろう。典型的に、転写を活性化するための誘導性制御領域に特異的に結合するタンパク質因子は、不活性型で存在してもよく、それは次いで直接的にまたは間接的に誘導物質により活性型に変換される。しかしながら、タンパク質因子もまた、不在であってもよい。誘導物質は、タンパク質、代謝産物、成長調節剤、除草剤もしくはフェノール化合物などの化学的薬剤、または熱、低温、塩、もしくは毒性エレメントにより直接的に課される生理的ストレス、もしくは間接的にウイルスなどの病原体もしくは病因物質の作用を介する生理的ストレスでありうる。噴霧、散水、加熱、もしくは同様の方法によってなど、外部から誘導物質を細胞もしくは植物に加えることによって、誘導性制御領域を含有する植物細胞が誘導物質にさらされてもよい。誘導性制御エレメントは、植物または非植物遺伝子のいずれか由来であってもよい(例えばGatz、C. and Lenk、I. R. P., 1998, Trends Plant Sci. 3、352-358; 出典明示により組み込まれる)。潜在的な誘導性プロモーターの例は、テトラサイクリン-誘導性プロモーター(Gatz、C., 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48、89-108; 出典明示により組み込まれる)、ステロイド誘導性プロモーター(Aoyama、T. and Chua、N. H., 1997, Plant J. 2、397-404; 出典明示により組み込まれる)およびエタノール-誘導性プロモーター(Salter、M. G., et al., 1998, Plant Journal 16、127-132; Caddick、M. X., et al., 1998, Nature Biotech. 16、177-180、出典明示により組み込まれる)、サイトカイニン誘導性IB6およびCKI1遺伝子(Brandstatter、I. and Kieber、J. J., 1998, Plant Cell 10、1009-1019; Kakimoto、T., 1996, Science 274、982-985; 出典明示により組み込まれる)およびオーキシン誘導性エレメント、DR5(Ulmasov、T., et al., 1997, Plant Cell 9、1963-1971; 出典明示により組み込まれる)を含むが、これらに限定されない。

【0099】

植物の様々な部分にわたって、および継続的に植物発達にわたって、構成的な制御領域は、遺伝子の発現を指示する。既知の構成的な制御エレメントの例は、CaMV 35S転写産物に関連するプロモーター(p35S; Odell et al., 1985, Nature, 313: 810-812)、ライスアクチン1(Zhang et al., 1991, Plant Cell, 3: 1155-1165)、アクチン2(An et al., 1996, Plant J., 10: 107-121)、またはtms2(米国5,428,147、出典明示により本明細書に組み込まれる)、およびトリオースリン酸イソメラーゼ1(Xu et al., 1994, Plant Physiol. 106: 459-467)遺伝子、トウモロコシユビキチン1遺伝子(Cornejo et al., 1993, Plant Mol. Biol. 29: 637-646)、シロイヌナズナユビキチン1および6遺伝子(Holtorf et al., 1995, Plant Mol. Biol. 29: 637-646)、タバコ翻訳開始因子4A遺伝子(Mandel et al., 1995, Plant Mol. Biol. 29: 995-1004)。キャッサバ葉脈モザイクウイルス(Cassava Vein Mosaic Virus)プロモーター、pCAS、(Verdaguer et al., 1996); リブロースニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニットのプロモーター、pRbcS:(Outchkourov et al., 2003)、pUbi(単子葉植物および双子葉植物のための)を含む。

【0100】

本明細書に記載されるように、葉発現における実証される効率を有するエンハンサー配列を含む制御領域が、一過性発現において効果的であるとわかった。いかなる理論にも拘

10

20

30

40

50

束されることを望むものではないが、核マトリックスへの付着による光合成遺伝子上流制御エレメントの付着が、強い発現を媒介しうる。例えばエンドウプラストシアニンの翻訳開始部位から - 784 まで (米国 7, 125, 978、出典明示により本明細書に組み込まれる) が、強いレポーター遺伝子発現を媒介するために使用されてもよい。

【0101】

本明細書に使用される用語「構成的な」は、構成的な制御領域の制御下のヌクレオチド配列が、全ての細胞タイプにおいて同一のレベルで発現されるが、存在量のバリエーションがよく観察されるとしても当該配列が広い範囲の細胞タイプにおいて発現されることを、必ずしも示すものではない。

【0102】

上記に記載されるような発現構築物が、ベクター中に存在してもよい。ベクターは、生物または宿主のゲノムへの発現カセットの導入およびインテグレーションを可能にするボーダー配列を含んでもよい。当該構築物は、植物バイナリーベクター、例えば pPZP (Hajdukiewicz, et al., 1994) に基づくバイナリー形質転換ベクターであってもよい。当該構築物の他の例は、pBin19 (Frisch, D. A., L. W. Harris-Haller, et al., 1995, Plant Molecular Biology 27: 405 - 409 を参照されたい) を含む。

【0103】

所望であれば、この発明の構築物は、選択可能なマーカーを含むようにさらに操作されてもよい。しかしながら、これは、必要とされなくてもよい。有用な選択可能なマーカーは、抗生物質、例えば、ゲンタマイシン (gentamycin)、ハイグロマイシン、カナマイシン、などの化学物質、またはホスフィノトリシン (phosphinothrycin)、グリホサート、クロルスルフロン (chlorosulfuron) などの除草剤への抵抗性を提供する酵素を含む。同様に、GUS (ベータ-グルクロニダーゼ) などの色変化、またはルシフェラーゼもしくは GFP などの発光により同定可能な化合物の生産のために提供する酵素が使用されてもよい。

【0104】

ベクターはまた、本明細書に記載される発現エンハンサーを含んでもよい。発現エンハンサーは、遺伝子サイレンシングのサプレッサーおよび NPTII も含有する T-DNA に位置されてもよい。ポリリンカーはまた、タンパク質精製を容易にするために、目的のタンパク質への N - または C - 末端 His - タグの包含を可能にする、1 つまたは 2 つの 6 x ヒスチジン残基のセットをコードしてもよい。

【0105】

転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) が、植物における導入遺伝子の発現を制限することを伴ってもよく、およびジャガイモウイルス Y (HcPro) 由来のサイレンシングサプレッサーの共発現が、導入遺伝子 mRNA の特異的な分解に対抗するために使用されてもよい (Brigneti et al., 1998, EMBO J. 17, 6739 - 6746、出典明示により本明細書に組み込まれる)。代替サイレンシングサプレッサーが、当技術分野でよく知られており、かつ本明細書に記載されるように使用されてもよい (Chiba et al., 2006, Virology 346: 7 - 14; 出典明示により本明細書に組み込まれる)、例えば、限定されないが、TEV-p1/HcPro (タバコ・エッチ・ウイルス (Tobacco etch virus) - p1/HcPro)、トマト・ブッシュ・スタント・ウイルス (Tomato bushy stunt virus) の BYV-p21、p19 (TBSV p19; p19 の構築は、WO2010/0003225 に記載される、出典明示により本明細書に組み込まれる)、トマト・クリンクル・ウイルス (Tomato crinkle virus) のカプシドタンパク質 (TCV - CP)、キュウリモザイクウイルスの 2b; CMV - 2b)、ジャガイモウイルス X の p25 (PVX - p25)、ジャガイモウイルス M の p11 (PVM - p11)、ジャガイモウイルス S の p11 (PVS - p11)、ブルーベリー・スコーチ・ウイルス (Blueberry scorch virus) の p16

10

20

30

40

50

、(BScV - p16)、シトラス・トリステザ・ウイルス(Citrus tristezza virus)のp23(CTV - p23)、ブドウ葉巻随伴病ウイルス(Grapevine leafroll-associated virus) - 2のp24、(GLRaV - 2 p24)、ブドウ葉巻ウイルスA(Grapevine virus A)のp10、(GVA - p10)、ブドウ葉巻ウイルスB(Grapevine virus B)のp14(GVB - p14)、ハナウド潜在ウイルス(Heracleum latent virus)のp10(HLV - p10)、またはニンニク共通潜在ウイルス(Garlic common latent virus)のp16(GCLV - p16)。

【0106】

10

従って、1つ以上のサイレンシングのサプレッサー、例えば、限定されないが、HcPro、TEV - p1/Hc - Pro、BYV - p21、TBSV p19、TCV - CP、CMV - 2b、PVX - p25、rgscam、FHV由来のB2タンパク質、CPMVの小コートタンパク質、およびTCV由来のコートタンパク質、PVM - p11、PVS - p11、BScV - p16、CTV - p23、GLRaV - 2 p24、GBV - p14、HLV - p10、GCLV - p16、またはGVA - p10が、さらに植物内で高レベルのタンパク質生産を保証するためにコモウイルス - ベースの発現カセット、ジェミニウイルス由来増幅エレメント、および目的のタンパク質をコードする核酸配列とともに共発現されてもよい。

【0107】

20

本発明の構築物は、Tiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接的なDNA形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、等を用いて植物細胞に導入されうる。かかる技術の評価のためには、例えばWeissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, pp. 421 - 463 (1988); Geier son and Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988); ならびにMiki and Iyer, Fundamentals of Gene Transfer in Plants, In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561 - 579 (1997)を参照されたい。他の方法は、直接的なDNA取り込み、リポソームの使用、エレクトロポレーション、例えばプロトプラストを用いるもの、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクトイル(microprojectile)またはウイスキー(whisker)、および減圧インフィルトレーション(vacuum infiltration)を含む。例えば、Bilang, et al. (1991, *Gene* 100:247 - 250)、Scheid et al. (1991, *Mol. Gen. Genet.* 228:104 - 112)、Guerche et al. (1987, *Plant Science* 52:111 - 116)、Neuhaus et al. (1987, *Theor. Appl. Genet.* 75:30 - 36)、Klein et al., (1987, *Nature* 327:70 - 73); Freeman et al. (1984, *Plant Cell Physiol.* 29:1353)、Howell et al. (1980, *Science* 208:1265)、Horsch et al. (1985, *Science* 227:1229 - 1231)、DeBlock et al., (1989, *Plant Physiology* 91:694 - 701)、*Methods For Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988)、*Methods In Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989)、WO92/0

30

40

50

9 6 9 6、WO 9 4 / 0 0 5 8 3、EP 3 3 1 0 8 3、EP 1 7 5 9 6 6、L i u a n d L o m o n o s s o f f (2 0 0 2、J V i r o l M e t h、1 0 5 : 3 4 3 - 3 4 8)、EP 2 9 0 3 9 5 ; WO 8 7 0 6 6 1 4 ; 米国特許番号 4 , 9 4 5 , 0 5 0 ; 5 , 0 3 6 , 0 0 6 ; および 5 , 1 0 0 , 7 9 2、1 9 9 5 年 5 月 1 0 日 出 願 の 米 国 特 許 出 願 番 号 0 8 / 4 3 8 , 6 6 6、お よ び 1 9 9 2 年 9 月 2 5 日 出 願 の 0 7 / 9 5 1 , 7 1 5 を 参 照 さ れ たい (これらの全ては出典明示により本明細書に組み込まれる)。

【 0 1 0 8 】

一過性発現方法を使用して、本発明の構築物を発現させもよい (D ' A o u s t e t a l . , 2 0 0 9 , M e t h o d s I n M o l e c u l a r B i o l o g y , V o l 4 8 3、p a g e s 4 1 - 5 0 ; L i u a n d L o m o n o s s o f f、2 0 0 2、J o u r n a l O f V i r o l o g i c a l M e t h o d s、1 0 5 : 3 4 3 - 3 4 8 を 参 照 さ れ たい ; 出 典 明 示 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る)。あるいは、K a p i l a e t a l . , (1 9 9 7、P l a n t S c i . 1 2 2、1 0 1 - 1 0 8 ; 出 典 明 示 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る)、または WO 0 0 / 0 6 3 4 0 0、WO 0 0 / 0 3 7 6 6 3 (これらは出典明示により本明細書に組み込まれる) により記載されるような減圧 - ベースの一過性発現方法が使用されてもよい。これらの方法は、例えば、限定されないがアグロイノキュレーション (A g r o - i n o c u l a t i o n) またはアグロインフィルトレーション (A g r o - i n f i l t r a t i o n)、シリンジインフィルトレーション (s y r i n g e i n f i l t r a t i o n) の方法を含んでもよいが、他の一過性方法もまた、上述のように使用されてもよい。アグロイノキュレーション、アグロインフィルトレーション、またはシリンジインフィルトレーションにより、所望の核酸を含むアグロバクテリアの混合物は、組織、例えば葉、植物の地上部分 (茎、葉および花を含む)、他の植物の部分 (茎、根、花)、または植物全体の細胞間隙に侵入する。表皮を横切った後、アグロバクテリアは感染し、かつ t - D N A コピーを細胞に導入する。t - D N A はエピソームとして転写され、および m R N A が翻訳され、感染される細胞における目的のタンパク質の生産をもたらすが、しかしながら、核内への t - D N A の通過は一過性である。

【 0 1 0 9 】

本明細書に記載される一過性タンパク質発現のための適切なプラットフォーム植物として使用されてもよい本発明の遺伝子構築物を含有するトランスジェニック植物、植物細胞または種子も、本発明の一部と見なされる。植物細胞から植物全体を再生する方法もまた、当技術分野で知られている (例えば Guerineau and Mullineau x (1 9 9 3、P l a n t t r a n s f o r m a t i o n a n d e x p r e s s i o n v e c t o r s : P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y L a b f a x (C r o y R R D e d) O x f o r d , B I O S S c i e n t i f i c P u b l i s h e r s , p p 1 2 1 - 1 4 8 を 参 照 さ れ たい)。一般的に、形質転換されている植物細胞は適切な培地において培養され、それは抗生物質などの選択的な薬剤を含有してもよく、ここで選択可能なマーカーは、形質転換されている植物細胞の同定を容易にするために使用される。カルスが形成されると、既知の方法に従い適切な植物ホルモンを用いることにより、シュート形成を促し、かつ当該シュートは、植物の再生のための発根培地に導入される。次に、種子から、または栄養繁殖技術を用いるいずれかで反復的発生 (r e p e t i t i v e g e n e r a t i o n) を樹立するために、当該植物が使用されてもよい。トランスジェニック植物は、組織培養を用いずに生成されうる。安定な形質転換、およびこれらの生物の再生のための方法は、当技術分野で樹立され、かつ当業者に知られている。利用可能な技術は、V a s i l e t a l . , (C e l l C u l t u r e a n d S o m a t i c C e l l G e n e t i c s o f P l a n t s , V o l I , I I a n d I I I , L a b o r a t o r y P r o c e d u r e s a n d T h e i r A p p l i c a t i o n s , A c a d e m i c P r e s s , 1 9 8 4)、および W e i s s b a c h a n d W e i s s b a c h、(M e t h o d s f o r P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y , A c a d e m i c P r

ess, 1989)において検討される。形質転換されている植物、および再生される植物を獲得する方法は、本発明に重要ではない。

【0110】

もし植物、植物の部分もしくは植物細胞が形質転換、または2つ以上の核酸構築物により共形質転換される場合、核酸構築物が、核酸がプールされる単一の遺伝子導入事象においてアグロバクテリウムに導入されてもよく、またバクテリア細胞は記載されるように遺伝子導入されてもよい。あるいは、構築物は連続的に導入されてもよい。この場合では、第一の構築物は、記載されるようアグロバクテリウムに導入され、唯一単独で形質転換されているバクテリアだけが、増殖することができる選択的な条件下（例えば抗生物質の存在下）で当該細胞を増殖させる。この第一の選択工程の後、第二の核酸構築物を、記載されるようアグロバクテリウム（*Agrobacterium*）に導入し、かつ二重 - 形質転換されているバクテリアだけが増殖することができる二重 - 選択的条件で細胞を増殖させる。その後、本明細書に記載されるように、二重 - 形質転換されているバクテリアが植物、植物の部分もしくは植物細胞を形質転換するために使用されてもよく、または第三の核酸構築物に適応するさらなる形質転換工程に供されてもよい。

10

【0111】

あるいは、もし植物、植物の部分、もしくは植物細胞が形質転換されている、または2つ以上の核酸構築物により共形質転換されているならば、アグロバクテリウム細胞と植物、植物の部分、または植物細胞の共インフィルトレーション性の（*co-infiltrating*）混合物によって、核酸構築物が、植物に導入されてもよく、それぞれアグロバクテリウム細胞が、植物内導入される1つ以上の構築物を含んでもよい。当該インフィルトレーションの工程の間に、構築物内の目的のヌクレオチド配列の植物、植物の部分または植物細胞内の相対発現レベルを変化させるために、所望の構築物を含む種々のアグロバクテリア集団の濃度は、変化されてもよい。

20

【0112】

本開示はさらに、本明細書で定義される発現系を含むトランスジェニック植物を提供し、ここで、本明細書に記載されるような発現系、例えばCPMV-HT（配列番号：2）の1つ以上の構成要素を欠く他の類似する発現系と比較して強化されるレベルで、カセットにおける目的の異種核酸は発現される。

【0113】

本開示はさらに、本明細書に記載される発現系を発現する植物、または植物の部分を提供する工程、少なくとも目的のタンパク質が発現されている組織を採取する工程、および任意に、組織から目的のタンパク質を単離する工程を含む、目的のタンパク質を生成するための方法を含む。

30

【0114】

従って、種々の態様において、限定無しに、本発明は：

- 配列番号：1もしくは3、または配列番号：1もしくは3のいずれか1つに記載の配列に100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%もしくは80%の同一性を示すヌクレオチド配列から選択されるコモウウイルス 5'UTRを含む発現エンハンサーであって、ここで、当該発現エンハンサーは、本明細書に記載される植物制御領域および植物において活性なコザック配列、例えば植物コザック配列に作動可能に連結される場合に、同一の植物制御領域を用いてCPMV-HT（配列番号：2；不完全なMTタンパク質を含む従来技術のエンハンサー配列、Sainsbury F., and Lomonossoff G.P., 2008, *Plant Physiol.* 148: pp. 1212 - 1218に記載される；出典明示により本明細書に組み込まれる）に融合された目的のヌクレオチド配列の発現レベルと比較される場合、発現エンハンサーに作動可能に連結される目的のヌクレオチド配列の発現レベルを増加させるものである、発現エンハンサーを提供する。

40

- 上記で定義されるようなコモウウイルス - ベースの発現エンハンサーもしくは発現カセット、プロモーター（制御領域）、任意にポリリンカー、コザック配列、目的のタンパク質

50

をコードする核酸、ならびにターミネーターを含む１つ以上の発現系を提供する。

- 本明細書に記載される１つ以上の発現系またはベクターを用いて、植物などの宿主生物において目的のタンパク質を発現する方法を提供する。

- 本発明の１つ以上の発現系またはベクターから目的のタンパク質を発現する宿主細胞および生物、ならびに当該宿主および生物を生産する方法を提供する。

【 0 1 1 5 】

表 2 : 配列のリスト

【表 2 - 1】

配列番号	説明	配列番号	説明
1	CPMV HT+	3 1	プライマー IF-HT 5* -PDI. c
2	CPMV HT	3 2	プライマー IF-HT 6* -PDI. c
3	CPMV HT+ WT 1 1 5	3 3	IF-HT 7* -PDI. c
4	CPMV HT+ (植 物コザックコンセンサス 配列)	3 4	IF-HT 8* -PDI. c
5	コンセンサス植物界コザ ック配列	3 5	PDISP/H1 Cali fornia のヌクレオチド 配列
6	コンセンサス双子葉類コ ザック配列	3 6	PDISP/H1 Cali fornia のアミノ酸配列
7	コンセンサスシロイヌナ ズナコザック配列	3 7	PDISP H5 Indo nesia のヌクレオチド配 列
8	コザック配列 AGA AA	3 8	PDISP H5 Indo nesia のアミノ酸配列

10

20

30

【表 2 - 2】

9	コザック配列 AGAC A	3 9	PDISP/H7 Hang zhouのヌクレオチド配列
1 0	コザック配列 AGGA A	4 0	PDISP/H7 Hang zhouのアミノ酸配列
1 1	コザック配列 AAAA A	4 1	PDISP/H7 Hang zhou+H5 Indon esia TMCTのヌクレ オチド配列
1 2	コザック配列 AAAC A	4 2	PDISP/H7 Hang zhou+H5 Indon esia TMCTのアミノ 酸配列
1 3	コザック配列 AAGC A	4 3	PDISP/HA B Br isbane (PrL-) の ヌクレオチド配列
1 4	コザック配列 AAG AA	4 4	PDISP/HA B Br isbane (PrL-) の アミノ酸配列
1 5	コザック配列 AAAG AA	4 5	PDISP/HA B Br isbane (PrL-) + H1 California TMCTのヌクレオチド配 列
1 6	コザック配列 AAAA GAA	4 6	PDISP/HA B Br isbane (PrL-) + H1 California TMCTのアミノ酸配列

10

20

30

【表 2 - 3】

17	コンセンサスコザック配列 (A/-) A (A/G) (A/G) (A/C) A	47	PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) のヌクレオチド配列
18	プライマー IF-PDI. S1+3c	48	PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) のアミノ酸配列
19	プライマー IF-H3 V36111. s1-4r	49	PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) +H1 California TMCTのヌクレオチド配列
20	PDISP/H3 Victoriaのヌクレオチド配列	50	PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) +H1 California TMCTのアミノ酸配列
21	構築物1191のヌクレオチド配列	51	HA B Wisconsin (PrL-) のヌクレオチド配列
22	発現カセット1391のヌクレオチド配列	52	HA B Wisconsin (PrL-) のアミノ酸配列
23	PDISP/H3 Victoriaのアミノ酸配列	53	HA B Wisconsin (PrL-) +H1 California TMCTのヌクレオチド配列
24	プライマー IF (SacII) -Kozac-PDI. c	54	HA B Wisconsin (PrL-) +H1 California TMCのアミノ酸配列

10

20

30

【表 2 - 4】

25	構築物 2181 のヌクレオチド配列	55	天然型 CPMV RNA2 ゲノムのセグメント、ヌクレオチド 1-514、(WO2009/087391、表 1)
26	発現カセット 1819 のヌクレオチド配列	56	CPMV RNA2 ゲノム、ヌクレオチド 1-514、115 および 162 で改変を有する
27	プライマー IF-HT 1*-PDI. c	57	パタチンシグナルペプチド (ヌクレオチド配列)
28	プライマー IF-HT 2*-PDI. c	58	パタチンシグナルペプチド (アミノ酸配列)
29	プライマー IF-HT 3*-PDI. c	59	HA 膜貫通ドメインコンセンサスアミノ酸配列
30	プライマー IF-HT 4*-PDI. c		

10

【0116】

20

実施例 1 : 2X35S / CPMV - HT / PDISP / H3 Victoria / NOS
(構築物番号 1391)

【0117】

天然シグナルペプチドがアルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのものにより置換されているインフルエンザ A / Victoria / 361 / 2011 由来の H3 (PDISP / H3 Victoria) をコードする配列を以下の PCR - ベースの方法を用いて、2X35S - CPMV - HT - NOS 発現ヘクローニングした。PDISP / H3 Victoria コーディング配列を含有するフラグメントを、PDISP / H3 Victoria 配列 (図 5C、配列番号 : 20) をテンプレートとして用いて、プライマー IF - PDI. S1 + 3c (図 5A、配列番号 : 18) および IF - H3V36111.s1 - 4r (図 5B、配列番号 : 19) を用いて増幅した。PCR 産物を In - Fusion クローニングシステム (Clontech、Mountain View、CA) を用いて 2X35S / CPMV - HT / NOS 発現系にクローニングした。構築物番号 1191 (図 5D および 5E、配列番号 : 21) を SacII および StuI 制限酵素で消化し、かつ線状化プラスミドを In - Fusion アセンブリー反応のために使用した。構築物番号 1191 は、CPMV - HT - ベースの発現カセットにおける目的の遺伝子の「In - Fusion」クローニングを企図するアクセプタープラスミドである。それはまた、アルファルファプラスチアニン遺伝子プロモーターおよびターミネーター下の TBSV P19 サイレンシングサプレッサーの共発現のための遺伝子構築物を組み込む。骨格は pCambia バイナリープラスミドであり、かつ左から右に配列 t - DNA ボーダーが図 5E に示されている (配列番号 : 21)。得られた構築物は、番号 1391 が与えられた (図 5F、配列番号 : 22)。PDISP に融合されたインフルエンザ A / Victoria / 361 / 2011 由来の成熟 H3 のアミノ酸配列は、図 5G に示されている (配列番号 : 23)。プラスミド 1391 の表示は、図 5H に示されている。

30

40

【0118】

実施例 2 : 2X35S / CPMV - HT + / PDISP / H3 Victoria / NOS
(構築物番号 1819)

【0119】

天然シグナルペプチドがアルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのものにより置換されている、インフルエンザ A / Victoria / 361 / 2011 由来の H

50

3 (P D I S P / H 3 V i c t o r i a) をコードする配列を以下の P C R - ベースの方法を用いて 2 X 3 5 S / C P M V - H T + / N O S 発現ヘクローニングした。P D I S P / H 3 V i c t o r i a コーディング配列を含有するフラグメントを P D I S P / H 3 V i c t o r i a 配列 (図 8 C 、 配列番号 : 2 0) をテンプレートとして用いて、プライマー I F (S a c I I) - コザック P D I . c (図 6 A 、 配列番号 : 2 4) および I F - H 3 V 3 6 1 1 1 . s 1 - 4 r (図 5 B 、 配列番号 : 1 9) を用いて増幅した。P C R 産物を I n - F u s i o n クローニングシステム (C l o n t e c h 、 M o u n t a i n V i e w 、 C A) を用いて 2 X 3 5 S / C P M V - H T + / N O S 発現系にクローニングした。構築物番号 2 1 8 1 (図 6 B) を S a c I I および S t u I 制限酵素で消化し、かつ線状化プラスミドを I n - F u s i o n アセンブリー反応のために使用した。構築物番号 2 1 8 1 は、C P M V - H T + ベースの発現カセットにおける目的の遺伝子の「I n F u s i o n」クローニングを企図するアクセプタープラスミドである。それはまた、アルファルファプラスチアニン遺伝子プロモーターおよびターミネーター下の T B S V P 1 9 サイレンシングサプレッサーの共発現のための遺伝子構築物を組み込む。骨格は p C A M B I A バイナリープラスミドであり、かつ左から右に配列 t - D N A ボーダーが図 6 C に示されている (配列番号 : 2 5) 。得られた構築物は、番号 1 8 1 9 が与えられた (図 6 D 、 配列番号 : 2 6) 。P D I S P に融合されたインフルエンザ A / V i c t o r i a / 3 6 1 / 2 0 1 1 由来の成熟 H 3 のアミノ酸配列は、図 5 G に示されている (配列番号 : 2 3) 。プラスミド 1 8 1 9 の表示は、図 6 E に示されている。

【 0 1 2 0 】

実施例 3 2 X 3 5 S / C P M V H T + / N O S 発現系における S a c I I 制限酵素部位と P D I S P / H 3 V i c t o r i a の A T G との間の配列のバリエーション (構築物番号 1 9 5 2 から 1 9 5 9)

【 0 1 2 1 】

改変フォワードプライマーを用いて、および全ての他の段階を同一に保って、2 X 3 5 S / C P M V H T + / N O S 発現系における S a c I I 制限酵素部位と P D I S P / H 3 V i c t o r i a の A T G との間の配列バリエーションを含む 8 構築物を、構築物番号 1 8 1 9 (実施例 2 を参照されたい) における同一の P C R - ベースの方法を用いて作製した。バリエーション H T 1 * から H T 8 * を図 7 A - 7 H において記載されるプライマーで増幅した :

I F - H T 1 * (- M p r o t) - P D I . c (図 7 A 、 配列番号 : 2 7) 、
I F - H T 2 * (- M p r o t) - P D I . c (図 7 B 、 配列番号 : 2 8) 、
I F - H T 3 * (- M p r o t) - P D I . c (図 7 C 、 配列番号 : 2 9)
I F - H T 4 * (- M p r o t) - P D I . c (図 7 D 、 配列番号 : 3 0)
I F - H T 5 * (- M p r o t) - P D I . c (図 7 E 、 配列番号 : 3 1)
I F - H T 6 * (- M p r o t) - P D I . c (図 7 F 、 配列番号 : 3 2)
I F - H T 7 * (- M p r o t) - P D I . c (図 7 G 、 配列番号 : 3 3) および
I F - H T 8 * (- M p r o t) - P D I . c (図 7 H 、 配列番号 : 3 4) 、
構築物番号 1 9 5 2 から 1 9 5 9 をそれぞれ作製するためのプライマー。プラスミド 1 9 5 2 の表示は図 7 I に示されている。類似する特徴を用いて構築物 1 9 5 3 - 1 9 5 9 を調製した。

【 0 1 2 2 】

実施例 4 : P D I S P / H 1 C a l i f o r n i a のための 2 X 3 5 S / C P M V H T (構築物番号 4 8 4) および H T + (構築物番号 1 8 0 5)

【 0 1 2 3 】

天然シグナルペプチドが、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのものにより置換されている、インフルエンザ A / C a l i f o r n i a / 7 / 2 0 0 9 由来の H 1 (P D I S P / H 1 C a l i f o r n i a) に対応するコーディング配列 (図 8 A 、 配列番号 : 3 5) を、元の H T および改変 H T + へ、それぞれ構築物 1 3 9 1 および 1 8 1 9 (実施例 1 および 2 を参照されたい) として、P D I S P / H 1 C a l i f o r

n i a に対して特異的に設計される改変 P C R プライマーを用いて、同一の P C R ベースの方法を用いてクローニングした。P D I S P に融合されたインフルエンザ A / C a l i f o r n i a / 7 / 2 0 0 9 由来の成熟 H 1 のアミノ酸配列（配列番号：36）は、図 8 B に示される。プラスミド 484 および 1805 の表示は、図 8 C および図 8 D に示される。

【0124】

実施例 5：H5 Indonesia のための 2 X 3 5 S / C P M V HT（構築物番号 409）および HT+（構築物番号 2319）

【0125】

天然シグナルペプチドが、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのものにより置換されている、インフルエンザ A / I n d o n e s i a / 5 / 2 0 0 5 由来の H 5（P D I S P / H 5 I n d o n e s i a）に対応するコーディング配列（図 9 A、配列番号：37）を、元の HT および改変 HT+へ、それぞれ構築物 1391 および 1819（実施例 1 および 2 を参照されたい）として、P D I / H 5 I n d o n e s i a に対して特異的に設計される改変 P C R プライマーを用いて同一の P C R ベースの方法を用いてクローニングした。P D I S P を有するインフルエンザ A / I n d o n e s i a / 5 / 2 0 0 5 由来の成熟 H 5 のアミノ酸配列は、図 9 B に示される（配列番号：38）。プラスミド 409 および 2319 の表示は、図 9 C および図 9 D に示される。

【0126】

実施例 6：P D I S P - H 7 H a n g z h o u のための 2 X 3 5 S / C P M V HT（構築物番号 2140）および HT+（構築物番号 2142）

【0127】

天然シグナルペプチドが、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのものにより置換されている、インフルエンザ A / H a n g z h o u / 1 / 2 0 1 3 由来の H 7（P D I S P / H 7 H a n g z h o u）に対応するコーディング配列（図 10 A、配列番号：39）を、元の HT および改変 HT+へ、それぞれ構築物 1391 および 1819（実施例 1 および 2 を参照されたい）として、P D I S P / H 7 H a n g z h o u に対して特異的に設計される改変 P C R プライマーを用いて、同一の P C R ベースの方法を用いてクローニングした。P D I S P に融合されたインフルエンザ A / H a n g z h o u / 1 / 2 0 1 3 由来の成熟 H 7 のアミノ酸配列は、図 10 B に示される（配列番号：40）。プラスミド 2140、2142 および 2168 の表示は、図 10 C および図 10 D に示される。

【0128】

実施例 7：P D I S P / H 7 H a n g z h o u + H 5 I n d o n e s i a T M C T のための 2 X 3 5 S / C P M V HT（構築物番号 2130）および HT+（構築物番号 2146）

【0129】

インフルエンザ A / I n d o n e s i a / 5 / 2 0 0 5 由来の H 5 の膜貫通ドメインおよび細胞質側末端（T M C T）に融合され、かつアルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのシグナルペプチドを有する、インフルエンザ A / H a n g z h o u / 1 / 2 0 1 3 由来の H 7（P D I S P / H 7 H a n g z h o u + H 5 I n d o n e s i a T M C T）の外部ドメインに対応するキメラヘマグルチニンコーディング配列（図 11 A、配列番号：41）を、元の HT および改変 HT+へ、それぞれ構築物 1391 および 1819（実施例 1 および 2 を参照されたい）として、P D I S P / H 7 H a n g z h o u + H 5 I n d o n e s i a T M C T に対して特異的に設計される改変 P C R プライマーを用いて、同一の P C R ベースの方法を用いてクローニングした。P D I S P に融合された H 7 H a n g z h o u + H 5 I n d o n e s i a T M C T のアミノ酸配列は図 11 B に示される（配列番号：42）。プラスミド 2130 および 2146 の表示は、図 11 C および 11 D に示される。

【0130】

10

20

30

40

50

実施例 8 : PDISP/HA B Brisbane (PrL-) のための 2X35S / CPMV HT (構築物番号 1039) および HT+ (構築物番号 1829)

【0131】

天然シグナルペプチドが、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのものにより置換されている、欠失タンパク質分解ループ (PrL-) を有するインフルエンザ B / Brisbane / 60 / 2008 由来の HA に対応するコーディング配列 (PDISP/HA B Brisbane (PrL-); 図 12A、配列番号: 43) を、元の HT および改変 HT+ へ、それぞれ構築物 1391 および 1819 (実施例 1 および 2 を参照されたい) として、PDISP/HA B Brisbane (PrL-) に対して特異的に設計される改変 PCR プライマーを用いて、同一の PCR ベースの方法を用いてクローニングした。PDISP に融合された成熟 HA B Brisbane (PrL-) のアミノ酸配列は、図 12B に示される (配列番号: 44)。プラスミド 1039 および 1829 の表示は、図 12C および 12D に示される。

10

【0132】

実施例 9 : PDISP/HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCT のための 2X35S / CPMV HT (構築物番号 1067) および HT+ (構築物番号 1875)

【0133】

インフルエンザ A / California / 7 / 2009 由来の H1 の膜貫通ドメイン および細胞質側末端 (TMCT) に融合され、かつアルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのシグナルペプチドを有する、欠失タンパク質分解ループ (PrL-) を有するインフルエンザ B / Brisbane / 60 / 08 由来の HA (PDISP/HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCT) の外部ドメインに対応するキメラヘマグルチニンコーディング配列 (図 13A、配列番号: 45) を、元の HT および改変 HT+ へ、それぞれ構築物 1391 および 1819 (実施例 1 および 2 を参照されたい) として、PDISP/HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCT に対して特異的に設計される改変 PCR プライマーを用いて、同一の PCR ベースの方法を用いてクローニングした。PDISP に融合された成熟 HA B Brisbane (PrL-) + H1 California TMCT のアミノ酸配列は、図 13B に示される (配列番号: 46)。プラスミド 1067 および 1875 の表示は、図 13C および 13D に示される。

20

30

【0134】

実施例 10 : PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) のための 2X35S / CPMV HT (構築物番号 2072) および HT+ (構築物番号 2052)

【0135】

天然シグナルペプチドが、アルファルファタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのものにより置換されている、欠失タンパク質分解ループ (PrL-) を有するインフルエンザ B / Massachusetts / 2 / 2012 由来の HA (PDISP/HA B Massachusetts (PrL-)) に対応するコーディング配列 (図 14A、配列番号: 47) を、元の HT および改変 HT+ へ、それぞれ構築物 1391 および 1819 (実施例 1 および 2 を参照されたい) として、PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) に対して特異的に設計される改変 PCR プライマーを用いて、同一の PCR ベースの方法を用いてクローニングした。PDISP に融合された成熟 HA B Massachusetts (PrL-) のアミノ酸配列は、図 14B に示される (配列番号: 48)。プラスミド 2072 および 2052 の表示は、図 14C および 14D に示される。

40

【0136】

実施例 11 : PDISP/HA B Massachusetts (PrL-) + H1 California TMCT のための 2X35S / CPMV HT (構築物番号 20

50

74) および HT + (構築物番号 2062)【0137】

インフルエンザ A / California / 7 / 2009 由来の H1 の膜貫通ドメイン
 および細胞質側末端 (TMCT) に融合され、かつアルファルファタンパク質ジスルフィ
 ドイソメラーゼのシグナルペプチドを有する、欠失タンパク質分解ループ (PrL -) を
 有するインフルエンザ B / Massachusetts / 2 / 2012 由来の HA (PD
 ISP / HA B Massachusetts (PrL -) + H1 California TMCT) の外部ドメインに対応するキメラヘマグルチニンコーディング配列 (図
 15A、配列番号: 49) を、元の HT および改変 HT + へ、それぞれ構築物 1391 お
 よび 1819 (実施例 1 および 2 を参照されたい) として、PDISP / HA B Ma
 ssachusetts (PrL -) + H1 California TMCT に対して
 特異的に設計される改変 PCR プライマーを用いて、同一の PCR ベースの方法を用いて
 クローニングした。PDISP に融合された成熟 HA B Massachusetts
 (PrL -) + H1 California TMCT のアミノ酸配列は、図 15B に示
 される (配列番号: 50)。プラスミド 2074 および 2062 の表示は、図 15C およ
 び図 15D に示される。

10

【0138】

実施例 12: HA B Wisconsin (PrL -) のための 2X35S / CPMV
HT (構築物番号 1445) および HT + (構築物番号 1839)

【0139】

天然シグナルペプチドを有し、欠失タンパク質分解ループ (PrL -) を有するインフ
 ルエンザ B / Wisconsin / 1 / 2010 由来の HA (HA B Wisconsin
 (PrL -)) に対応するコーディング配列 (図 16A、配列番号: 51) を、元の
 HT および改変 HT + へ、それぞれ構築物 1391 および 1819 (実施例 1 および 2 を
 参照されたい) として、HA B Wisconsin (PrL -) に対して特異的に設
 計される改変 PCR プライマーを用いて、同一の PCR ベースの方法を用いてクローニ
 グした。天然シグナルペプチドを有する HA B Wisconsin (PrL -) のア
 ミノ酸配列は、図 16B に示される (配列番号: 52)。プラスミド 1445 および 18
 39 の表示は、図 16C および 16D に示される。

20

【0140】

実施例 13: HA B Wisconsin (PrL -) + H1 California
TMCT のための 2X35S / CPMV HT (構築物番号 1454) および HT + (
構築物番号 1860)

30

【0141】

インフルエンザ A / California / 7 / 2009 由来の H1 の膜貫通ドメイン
 および細胞質側末端 (TMCT) に融合され、HA B Wisconsin の天然シグ
 ナルペプチドを有し、欠失タンパク質分解ループ (PrL -) を有するインフルエンザ B
 / Wisconsin / 2 / 2012 由来の HA (HA B Wisconsin (Pr
 L -) + H1 California TMCT) の外部ドメインに対応するキメラヘマ
 グルチニンコーディング配列 (図 17A、配列番号: 53) を、元の HT および改変 HT
 + へ、それぞれ構築物 1391 および 1819 として、HA B Wisconsin (Pr
 L -) + H1 California TMCT に対して特異的に設計される改変 P
 CR プライマーを用いて、同一の PCR ベースの方法を用いてクローニングした。HA
 B Wisconsin (PrL -) + H1 California TMCT のアミノ
 酸配列は、図 17B に示される (配列番号: 54)。プラスミド 1454 および 1860
 の表示は、図 17C および 17D に示される。

40

【0142】

実施例 14: アグロバクテリウム遺伝子導入

【0143】

D' Aoust et al 2008 (Plant Biotechnology

50

Journal 6:930-940)により記載される方法を用いて、DNA構築物をエレクトロポレーションによりアグロバクテリウム株AGL1に遺伝子導入した。10 mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、20 μMアセトシリンゴン、50 μg/mlカナマイシンおよび25 μg/mlのカルベニシリンを補充したpH 5.6のYEB培地において、遺伝子導入されているアグロバクテリウムを0.6および1.6間のOD 600まで増殖させた。浸潤培地(10 mM MgCl₂ および10 mM MES pH 5.6)において使用および再懸濁される前に、アグロバクテリウム懸濁液を遠心分離した。

【0144】

植物バイオマス、接種源およびアグロインフィルトレーションの調製

10

本明細書に使用される用語「バイオマス」および「植物物質」は、植物由来の任意の物質を反映するよう意図される。バイオマスまたは植物物質は、植物全体、組織、細胞、またはそれらの任意の画分を含んでもよい。さらに、バイオマスまたは植物物質は、細胞内の植物構成要素、細胞外の植物構成要素、植物の液体もしくは固体抽出物、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。さらに、バイオマスまたは植物物質は、植物の葉、茎、果実、根またはそれらの組み合わせ由来の、植物、植物細胞、組織、液体抽出物、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。植物の一部が、植物物質またはバイオマスを含んでもよい。

【0145】

市販の基材ピートモスで満たされる平地で、種子からニコチアナ・ベンサミアナ(Nicotiana benthamiana)植物を生長させた。当該植物を16/8光周期および、日中25/夜20の温度管理体制下で温室において生長するようにした。播種から3週間後、個々の苗木を取り出し、鉢に移植し、かつ同じ環境条件下でさらに3週間温室で生長させた。

20

【0146】

10 mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、20 μMアセトシリンゴン、50 μg/mlカナマイシンおよび25 μg/mlのカルベニシリンを補充したpH 5.6 YEB培地において、それぞれ構築物が遺伝子導入されているアグロバクテリアを0.6および1.6間のOD 600に達するまで増殖させた。浸潤培地(10 mM MgCl₂ および10 mM MES pH 5.6)において使用および再懸濁される前にアグロバクテリウム懸濁液を遠心分離し、かつ一晩4°Cで貯蔵した。浸潤の日に、培養バッチを2.5培養容積で希釈し、かつ使用前にあたためた。N. benthamianaの植物全体を2分間20-40トルの真空下で気密ステンレススチールタンクにバクテリア懸濁液に逆さまに置いた。採取までの2-6日インキュベーション期間のために、植物を温室に戻した。

30

【0147】

葉の採取および総タンパク質抽出

【0148】

インキュベーション後、植物の地上の一部を採取し、-80°Cで凍結し、かつ破碎した。3倍容積の、冷50 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl、0.1% Triton X-100および1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル(phenylmethanesulfonyl fluoride)において、凍結-破碎の植物物質のそれぞれのサンプルをホモジナイズ(Polytron)することで総可溶性タンパク質を抽出した。ホモジナイゼーション後、スラリーを4°Cで10分間、10,000 gで遠心分離し、かつこれらの清澄粗抽出物(上清)を解析のために保存した。

40

【0149】

実施例15：血液凝集アッセイ

【0150】

清澄粗抽出物の総タンパク質含量は、参照標準としてウシ血清アルブミンを用いるブラッドフォードアッセイ(Bio-Rad、Hercules、CA)により決定した。

50

【 0 1 5 1 】

血液凝集アッセイは、Nayak and Reichl (2004) により記載される方法に基づいた。簡潔には、ウェルあたりに希釈されるサンプルの100 μ Lを残して試験サンプル(100 μ L)の二倍段階希釈を、100 μ L PBSを含有するV - 底96 - 穴マイクロタイタープレートにおいて作製した。0.25%ターキー赤血球懸濁液(Bio Link Inc., Syracuse, NY; 全てのB株、H1、H5およびH7のため)または0.5%モルモット赤血球懸濁液(H3のため)の100マイクロリッターをそれぞれのウェルに加え、および室温で2時間プレートをインキュベートした。HA活性として、完全な血液凝集を示す最大希釈の逆数を記録した。

【 0 1 5 2 】

全ての引用文献は、出典明示により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 5 3 】

1つ以上の実施形態に関して、本発明は記載されている。しかしながら、請求項に明らかにされるような本発明の範囲から逸脱することなく多くの変形および改変を行えることは当業者には自明であろう。

10

【 図 1 - 1 】

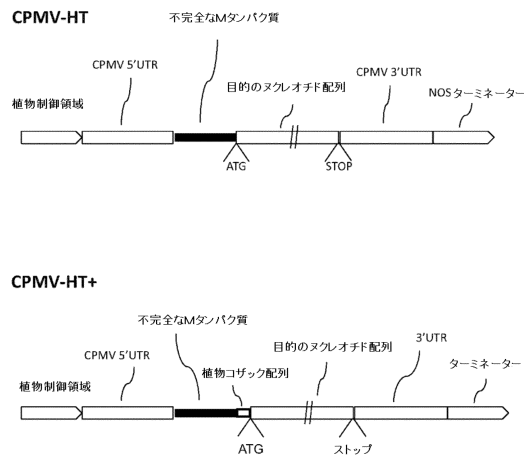


Figure 1a

【 図 2 】

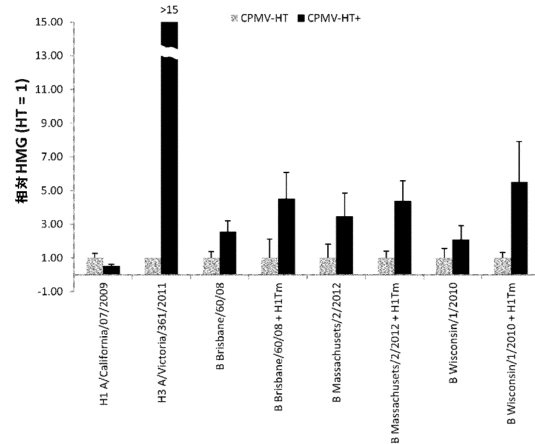


Figure 2

【 図 1 - 2 】

- CPMV HT
 - 2X35S...TTCATTGGAGAGGTATTAAAA...(CPMV HT 5'UTR)...ACCACTACA(ACG)TTTT...Mタンパク質 (不完全)...AAATTGTGCGGGCCCATG...(GOI)
- CPMV HT+
 - 2X35S...TTCATTGGAGAGGTATTAAAA...(CPMV HT 5'UTR)...ACCACTACA(ACG)TTTT...Mタンパク質 (不完全)...AAATTGTGCGGGCCCAATACCGCGGAGAAAATG...(GOI)

Figure 1b

【 図 3 】

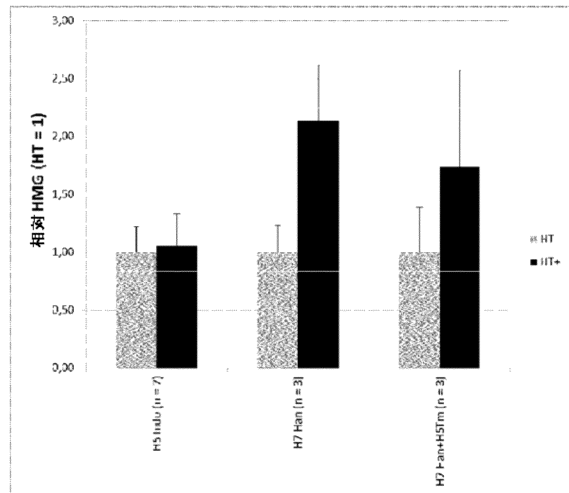


Figure 3

【 図 4 】

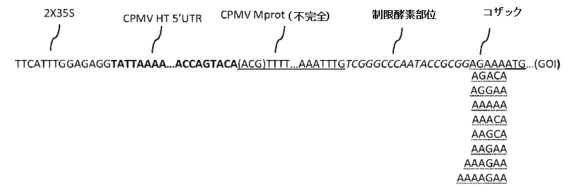


Figure 4a

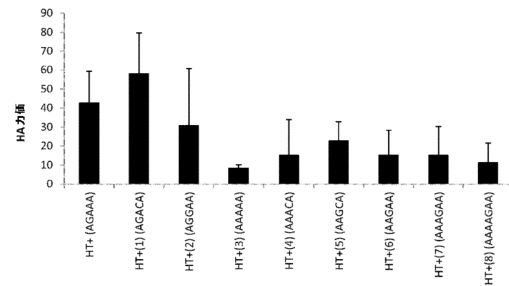


Figure 4b

【 図 5 - 1 】

Figure 5 A-2X35S/CPMV-HT/ PDISP/H3 Victoria/ NOS (構築物番号1391)

Figure 5A

IF-PDI.S1+3c (配列番号:18)

AAATTTGTCGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTG

Figure 5B

IF-H3V36111.s1-4r (配列番号:19)

ACTAAAGAAAATAGGCCTTCAAATGCAAATGTTGCACCTAATGTTGCCCTT

Figure 5C

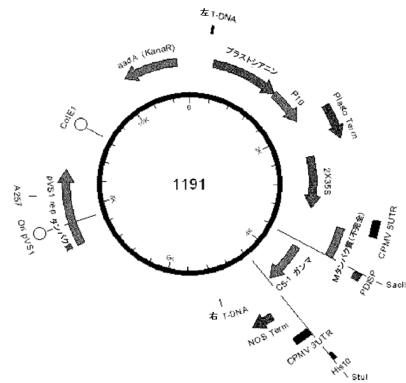
PDISP/H3 Victoriaのヌクレオチド配列。(配列番号:20)

TTGCGCAAAAGATCTGCAGTCTGCGCTAATGTTTCTCTCTGTGTTGGTCTCTCTTCAGAAATCGCCCAAAACAT
ATTCCTCAAGACACACGACACGGCAGCATGTCTGTGGCCACATGAGTCAACCAAGACAGTAAGTGAJAAACAT
CATCAGATGACCAAAATGGAATGATCAATGCTAGCTGAGCTGTCAGAAATCTCCTAAATGGTGAAATATGACGAGCTCT
CATCAGATGCTCTGGGAGGAAATCGATGCATTAATGATGCTCTATTTGGGAGACAGCTCAGTGTGTGCTTCCAAATAT
AAGAAATGGGACATGTTTGTGAACAGAGCAACGATACAGCAACATGTACCTTATCTGTGTGCGGGATATGCTCTCTCT
TAGGTACCATAGTGCCTCATCTCGGCACATGGAGTTTACATCATGAAGCTCATATGGATGGAGTCACTCAAACACGGA
ACAGATCTCTGCTGCATTAAGGAGATCAATAATATGATTTCTTGTAGTAAATATGGTTGGCCACCTACATCTCAAT
ACCCAGCATATGACGTGATCTGCAACATATGACAAATATGGCAAAATATGCAATTTGGGGGGTTCACCAACCCGGGTG
GCGACAGGACCAACTCTCTCTGTGATATCAAGATATATCAAGGAGAAATCAGCATGATCTCAACAAAGACAGCAACAGCTGA
TATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTAT
GAGCATCAATCTTGATTAAGCAAGGAAATCAATATGCTCTAGGGGGTCTTCAAATATCAAGATGGGAAAGAACTCT
ATATATAGCATAGTGTGACAGTCAATCTGGCCAAATCTGCGGCTGATCATCTCAAATGAGACATCTCCATATGACAA
CATCTCCAAATGTAGCAACAGGATACATACAGGAGCTGCTCCAGATATGTATGAGCAAGACATCTGAATTTGGACACG
GAATGCGATGTGTACACGAGAAACAAATAGGAGCATATTTGGGCGCATACGGGGTGTCTATAGAAATGTGTGGGAGGG
AATGGTGGATGTTGGTGTGACGTTTTCAGGATCAAAATTTGGGGAAGAGGAGCAAGCAGCAGATCTCAAAAGACGCT
CAGCAGAACTGATCAAACTCAAGGAGGAGTCAATGATGTTGCGGGAAAGAACACAGGAAATCTCTCAGTTTGGAAAGAT
AATTTCTCAGAGTGCAGAGGAGGAATCAGAGCATCTAGGAATATGTGTGGGACATTAATATAGATCTTGATCATATCA
CAATGATGATCTGTGGCTTGGGACACACATACATATGATCTACATGCTGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTAT
ACAGAGAGGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTATGAGTAT
CATAGGATCAATCAGAAATGAGATATGACACAGATATGACATTAAGCAAGAAACCCGTTCCAGATGACAA
GGGATGTTGGGCTGATGACGAGGATGACAAATATGGATCATATGATTTCTTCCCATCATATGTTTGTCTTGTGTT
CTGTTGTGGGCTGATGACGTTGGGCTGCCAAATAGGCCACATATAGTGGCAACATCATGTTTGA

【 図 5 - 2 】

Figure 5D

構築物1191の概略図。プラスミド線状化のために使用されるSacIIおよびStuI制限酵素部位は当該図に注記される。



【 図 6 - 1 】

Figure 6: B-2X35S/CPMV-HT+/ PDISP/H3 Victoria/ NOS (構築物番号1819)

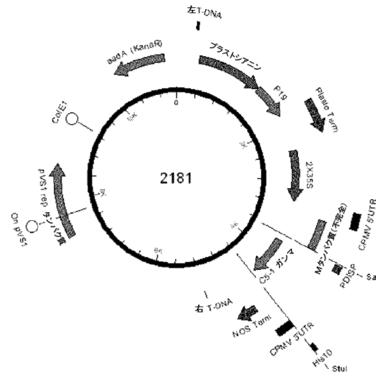
Figure 6A

IF(SacII)-Kozac_PDI.c (配列番号:24)

GTCGGGCCCAATACCGCGGAGAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTC

Figure 6B

構築物2181の概略図。プラスミド線状化のために使用されるSacIIおよびStuI制限酵素部位は当該図に注記される。



【图 7 - 2】

Figure 71 構築物番号1952の概略図。類似する特徴を使用して構築物1953-1959を調製した。

(配列番号:27) IF-HT1*-PDL c(下線は元の1819構築物からの改変配列)

GTCGGGCCCAATACCGCGGAGACAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCT

(配列番号:28) IF-HT2*-PDL c(下線は元の1819構築物からの改変配列)

GTCGGGCCCAATACCGCGGAGGAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCT

(配列番号:29) IF-HT3*-PDI. c(下線は元の1819構築物からの改変配列)

GTCGGGCCCAATACCGCGGAAAAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCT

(配列番号:30) IF-HT4*-PDI. c(下線は元の1819構築物からの改変配列)

GTCGGGCCCAATACCGCGGAAACAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCT

(配列番号:31) IF-HT5*-PDL c(下線は元の1819構築物からの改変配列)

GTCGGGCCCAATACCGCGGAAGCAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCT

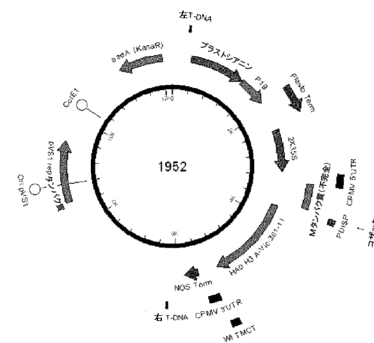
(配列番号:32) IF-HT6*-PDI. c(下線は元の1819構築物からの改変配列)

GTCGGGCCCAATACCGCGGAAGAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCT

(配列番号:33) IF-HT7*-PDI. c(下線は元の1819構築物からの改変配列)
GTCGGGCCCAATACCGCGGAAAGAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCT

(配列番号:34) IF-HT8*-PDL c(下線は元の1819構築物からの改変配列)

GTCGGGCCCAATACCGCGGAAAAGAAATGGCGAAAAACGTTGCGATTTCGGCT



【 図 8 - 2 】

Figure 8C 構築物番号484(2X35S/CPMV HT)の概略図

GTGATCGAAAAAGCTTGCAGACAGGCTTCAATGTTCTCTCTCTCTGTTGGTCTTCATAGATCTCTGCTGCAAGAAATATGATATGA
TTGATCTGACCAACTTACCAAGCACTGACGACCAAGCTAGGAAGAAGTCTTCCAGATTAACCACTCTGTGAATCTTCTAGCA
ACAGACAGTACCGGAAAGCTTCCCAAGTAGAGGGGTGACGCCCTTCACTTGGGTGAATGAACATCTGGCTGGGATGCTCTGG
GAATCCGAGTGTGGTGAATCACTCTCAAGTCAAGGACATGTCGATGCTATCTGTTGAACAAAGCTTACAGCAATCTGAGTCTGG
CAGAGGATTTCTCATGATATAGGAGCTAGAGGAAAGTATGAGCTCATGATCTTATTTGAAGTGTGTGATATATCTCCCAAG
CTTCACTGTGGCCCAATCTGCTGACGAAACAAAGGTAAAGCGAGTCGATCTCATCTGTCGAGGAAAACTTGCAAAATTAAT
ATGATGTGCTATTAAGAAAAAGGAAATATCATCCCAAGCTCAGCAAACTCATATTAATGATTAAGAAAAAGAAAGTCTCTCTGTC
TATGAGGCTTACCATCTCACTTCAAGTGTGACCAACCAAGTCTTCTATGAGATCAGATGATCTTCTTTTGGGGGTATCTCAAG
TACAGACCAAGAAAGTACCGCGGAAATGACATAAAGAACCAAGTAGGGGTGACGAAAGGAAAGTAAAGTAACTATTCAGCAATC
AGTAGAGGCGGGAGCAACAAATCACTTCAAGCAAGTCTGAAATCATGAGGTGACCGGATATGATCTCGAATGAAGAAAGAAATG
TCGATTTGTGATATCATCTGACACACAGCTCAGGATTCAGTAACAATCTCTGCAACCAACCAAGGAGTCTGTAAACAAACAGCCG
TCCCATTCGATTAATACATCCGATCAAGTCTGAAATTTGCAAAATATGAAGAAAGAAAGAAATGAGATCGGCGACAGGTGTG
AGGAATATCCCGCTTGATCTACAGAGGACATCTTGGGGCAATTCGCGTTTCTATGAAGGGGGGTGACGAGGGATGGTAGAT
GGATGTGATGTGATTTACCATCAAAATGACGAGGGGTGAGGATATGATCGACGAGCTGACAGCAAGTACAGCAAGTGTACGACG
ATGATCAACAAAGTAATTTGTTTGAAGAAAGTAAATCAACAGCTGAGTGTGAGGAGGATTCACCAACTCGGAAAGAAAT
TTGATTTGATTTATTAAGAAAGTGTGATGTTCTGCGGCAATTTGGCATCTGTTGATGAGGAGGCTGGTTGTCTGCAAGT
GAAGCAATGAT
GAAGCAATGAT
ATGACAAAGCGCTCGTTGAATTTTACCAAAATCGATACAGTACGTTGAAGATGTCGAAATGGGATCTATGATCCCAATCA
ATTCAATCAGAGGAAAGAAATTAACAGAGGAAGAAATGATGGGTGAAGCTGGAAGTACCAAGGAATTTACCAAGTATTTGGGCA
TCTTCAAGCTCGCCGAGTCAATGGTATCGTGTGATGCTCCCTGGGGGCAACATGTTCTGSGATGTGCTCTAATGGGCTTCTAGAT
GTGATTTATGATTTATGTTAA

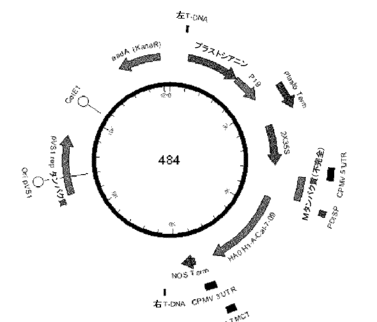
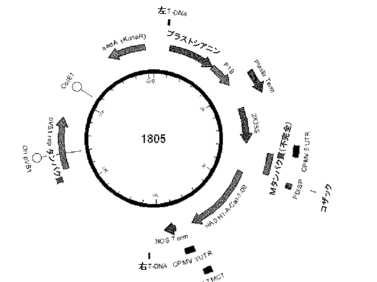


Figure 8D 構築物番号1805(2X35S/CPMV HT+)の概略図

MAKNVAIFGLFSLVLVPSQFADTLGICGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLDEKHNGKLCRLRGVAPLHCGKNAGIWLGNPE
 CKSLTASSTWYVYTPSSQNGTQDQGLDYFEELRGLSGYFQKSPFWPHNSDNKGVCYAPACAAHGAAGSKPKYMLVNLWY
 PYKLSYLVINDKGKGVVLWGLHGPSTSDGQGLQYADAYVFGSSGRYSKTPWIRNDVQVQDGRNGVYVDFGDKITFATNG
 LVTPYRAIFERNAGSIOGSLVDPTDNCNTKQPAINDSTLFPONHIFITVYVSTYKTLRLATLRINPSIOGRGLGAAGFIEG
 VLVMDGVGYVYTHQNEGSGDYADADKQKGAIDETNKTVSMIEKMTQGTAFVGEKHLREKLNKLNLGDDGLFVITNAELL
 TVALEENLSTHMLKLVKYSVAGKLNKAIEGCGFFCYHFHKNDCNTMESVKNGTDPYKPYSEAKLNREEGDGLKSTRYQILAYS
 VLNSLVVLSGAISSFVMSGSLGQRCI*



【 図 9 - 2 】

Figure 9C 構築物番号489(2X35S/CPMV HT)の概略図

[illegible]

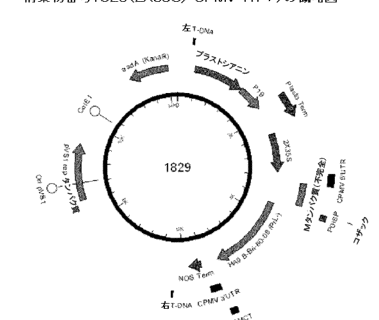
Figure 9D 構築物番号1889(2X35S/CPMV HT+)の概略図

【 図 1 0 - 2 】

Figure 10C 構築物番号2140(2X35S/CPMV HT)の概略図

[illegible]

Figure 10D 構築物番号2142(2X35S/CPMV HT+)の概略図

[illegible]

【 図 1 3 - 2 】

構築物番号1067(2X35S/CPMV HT)の概略図

左: Y-DN_{64} 左: Y-DN_{64}

構築物番号1875(2X35S/CPMV HT+)の概略図

The diagram shows a circular representation of the year 1876 (Genna). The center contains the number "1876". Around the circle are twelve months labeled with kanji: 一月 (Jan), 二月 (Feb), 三月 (Mar), 四月 (Apr), 五月 (May), 六月 (Jun), 七月 (Jul), 八月 (Aug), 九月 (Sep), 十月 (Oct), 十一月 (Nov), and 十二月 (Dec). Various events and astronomical phenomena are indicated by arrows pointing to specific dates or periods:

- January:** 壬子 (Benchū) at the start; 大雪 (Daigetsu) around Jan 20.
- February:** 立春 (Risshun) around Feb 3.
- March:** 春分 (Shunbun) around Mar 20.
- April:** 穀雨 (Gokuryū) around Apr 20.
- May:** 立夏 (Rishō) around May 6.
- June:** 芒種 (Mangō) around Jun 21.
- July:** 夏至 (Geshi) around Jul 22.
- August:** 立秋 (Rishū) around Aug 8.
- September:** 白露 (Hakuro) around Sep 23.
- October:** 秋分 (Shūbun) around Oct 23.
- November:** 立冬 (Rishō) around Nov 8.
- December:** 小雪 (Seiyo) around Dec 23.

Other significant events and celestial occurrences are noted outside the circle:

- January:** 壬子 (Benchū) at the top.
- February:** プラズマゲーン (Plasma Gun) above the circle.
- March:** 春分 (Shunbun) below the circle.
- April:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.
- May:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.
- June:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.
- July:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.
- August:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.
- September:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.
- October:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.
- November:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.
- December:** 大規模な地震 (Great Earthquake) below the circle.

【 図 1 4 - 2 】

Figure 14C 構築物番号2072(2X35S/CPMV HT)の概略図

左: DNA

左: DNA

[illegible]

Figure 14D 構築物番号2052(2X35S/CPMV HT+)の概略図

[illegible][illegible][illegible]

【 図 1 5 - 2 】

Figure 15C 構築物番号2074(2X35S/CPMV HT)の概略図

[illegible]

Figure 15D 構築物番号2062(2X35S/CPMV HT+)の概略図

【 図 1 6 - 2 】

Figure 16C

構築物番号1445(2X35S/CPMV HT)の概略図

Figure 16D

構築物番号1839(2X35S/CPMV HT+)の概略図

Figure 16D

構築物番号1839(2X35S/CPMV HT+)の概略図

[illegible][illegible]

【 図 1 7 - 2 】

Figure 17C

構築物番号1454(2X35S/CPMV HT)の概略図

Figure 17D

構築物番号1860(2X35S/CPMV HT+)の概略図

[illegible]

Figure 17D

構築物番号1860(2X35S/CPMV HT+)の概略図

[illegible][illegible]

0006599354000001 . app

フロントページの続き

(72)発明者 ピエール - オリヴィエ・ラヴォワ

カナダ、ジー・１エヌ・２エル７、ケベック、ケベック、フランクリン６２１番

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 特表２０１３－５４５４５４（ＪＰ，Ａ）

特表２００３－５１８３７７（ＪＰ，Ａ）

特表２０１３－５０３６４０（ＪＰ，Ａ）

Rangan L. et al. , Analysis of context sequence surrounding translation initiation site from complete genome of model plants , Molecular Biotechnology , 2008年 , 39(3) , 207-213

Joshi CP. et al. , An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes , Nucleic Acids Research , 1987年 , 15(16) , 6643-6653

Kanagarajan S. et al. , Transient expression of hemagglutinin antigen from low pathogenic avian influenza A (H7N7) in Nicotiana benthamiana , PLoS One , 2012年 , 7(3) , e33010

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq