

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2012 年 8 月 30 日(30.08.2012)



(10) 国際公開番号  
**WO 2012/115102 A1**

- (51) 国際特許分類:  
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
A01G 16/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/054122
- (22) 国際出願日: 2012 年 2 月 21 日(21.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2011-035558 2011 年 2 月 22 日(22.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立  
大学法人京都大学(Kyoto University) [JP/JP]; 〒  
6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地  
1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小川 洋一  
(OGAWA Yoichi) [JP/JP]; 〒3510114 埼玉県和光市  
本町 8 丁目 1 番 株式会社ホンダ・リサーチ・  
インスティテュート・ジャパン内 Saitama (JP).  
近藤 康弘(KONDO Yasuhiro) [JP/JP]; 〒3510114 埼  
玉県和光市本町 8 丁目 1 番 株式会社ホンダ・  
リサーチ・インスティテュート・ジャパン内  
Saitama (JP). 西村 いくこ(NISHIMURA Ikuko)  
[JP/JP]; 〒6068502 京都府京都市左京区北白川追  
分町 国立大学法人京都大学大学院理学研究科  
内 Kyoto (JP). 嶋田 知生(SHIMADA Tomoo)  
[JP/JP]; 〒6068502 京都府京都市左京区北白川追  
分町 国立大学法人京都大学大学院理学研究科  
内 Kyoto (JP). 白川 一(SHIRAKAWA Makoto)  
[JP/JP]; 〒6068502 京都府京都市左京区北白川追

分町 国立大学法人京都大学大学院理学研究科  
内 Kyoto (JP).

- (74) 代理人: 志賀 正武, 外(SHIGA Masatake et al.); 〒  
1006620 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号  
Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,  
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,  
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA,  
RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,  
SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保  
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,  
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ  
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー  
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,  
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
(規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR ACCUMULATING PROTEIN IN PLANT CELL

(54) 発明の名称: タンパク質の植物細胞内への蓄積方法

(57) Abstract: A method for accumulating a protein in a plant cell, said method comprising co-expressing in the plant cell a gene, which encodes a polypeptide capable of forming an ER body, with a gene, which encodes a target protein having, at the N-terminus thereof, an intracellular membrane system localization signal peptide and also having, at the C-terminus thereof, an ER retention signal peptide, and thus accumulating said target protein or a protein lacking the N-terminal domain of the target protein within the ER body that is formed in said plant cell.

(57) 要約: タンパク質を植物細胞内に蓄積させる方法であって、ER ボディ形成機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子と、N 末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを有し、かつ C 末端に ER 保留シグナルペプチドを有する標的タンパク質をコードする遺伝子とを植物細胞内に共発現させることにより、前記植物細胞内に形成された ER ボディの内部に、前記標的タンパク質又は前記標的タンパク質の N 末端領域が欠損したタンパク質を蓄積させる、タンパク質の植物細胞内への蓄積方法。



WO 2012/115102 A1

## 明 細 書

発明の名称：タンパク質の植物細胞内への蓄積方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質を植物細胞内の特定の細胞内小器官に蓄積させる方法、及び、前記方法により作製された形質転換植物に関する。

本願は、2011年2月22日に、日本に出願された特願2011-035558号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

### 背景技術

[0002] 遺伝子組換え技術の進歩により、培養細胞や植物個体中の細胞に、目的のタンパク質をコードする遺伝子を導入し、前記タンパク質を細胞内に発現させることができるようになった。一般的には、植物の核ゲノムに遺伝子を導入してタンパク質を発現させる際に、目的タンパク質をコードする遺伝子領域のみを細胞内に導入した場合には、発現したタンパク質は細胞質に蓄積する。また、目的タンパク質のN末端にシグナルペプチドと呼ばれる数アミノ酸を付加したタンパク質をコードする遺伝子を導入することにより、発現させたタンパク質を、ER（小胞体）、液胞、葉緑体などの細胞内小器官と呼ばれる箇所あるいは細胞外領域（アポプラスト）に移行・蓄積させることができる（非特許文献1参照。）。

その他、目的タンパク質をコードする遺伝子を、葉緑体のゲノムそのものに導入し、葉緑体内で遺伝子発現からタンパク質蓄積までを行う技術もある（非特許文献2参照。）。

[0003] また、タンパク質を特異的に蓄積する細胞内小器官として、プロテインボディやERボディなどが知られている（非特許文献3参照。）。プロテインボディは植物の種子にのみ局在しており、ERボディはアブラナ科などを含むフウチョウソウ目植物の幼苗にのみ局在している。フウチョウソウ目アブラナ科に属するシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）において、ERボディ形成不全変異体では、*nai2* 遺伝子に機能不全

変異が生じており、この変異体に野生型の *na i 2* 遺伝子を導入することによって E R ボディが形成されること、E R ボディには  $\beta$  - グルコシダーゼである *Py k 1 O* が蓄積されているが、E R ボディ形成不全変異体では、*Py k 1 O* は E R 全体に分散して局在していることなどが報告されている（非特許文献 4 ～ 8 参照。）。

[0004] 一方で、タンパク質を既存の細胞内小器官に蓄積する従来技術においては、タンパク質の種類によっては、蓄積した細胞内小器官及びその細胞の機能、ひいては植物体の生育に悪影響を及ぼす場合がある。例えば、植物細胞壁由来のセルロースを糖に加水分解する糖化酵素を発現・蓄積した植物は、バイオエタノール生産に好適な原料と成り得ることが期待される。しかしながら、このような糖化酵素を人工的に発現・蓄積させたイネでは、さまざまな生理的・形態的異常を生じることが報告されている（非特許文献 9 参照。）。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0005] 非特許文献 1 : Twyman, et al., Trends Biotechnol. 2003, 21(12):570-578.  
非特許文献 2 : Verma, et al., Plant Physiol. 2007, 145(4):1129-1143.  
非特許文献 3 : Hara-Nishimura I, et al., Plant Physiol. 2004, 136(3):3435-3439.  
非特許文献 4 : Yamada, et al., Plant Cell. 2008, 20(9):2529-2540.  
非特許文献 5 : Yamada, et al., Plant Signal Behav. 2009, 4(9):849-852.  
非特許文献 6 : Matsushima R, et al., Plant J. 2003, 33(3):493-502.  
非特許文献 7 : Matsushima R, et al., Plant Physiol. 2002, 130(4):1807-1814.  
非特許文献 8 : Matsushima R, et al., Plant Cell. 2004, 16(6):1536-1549.  
非特許文献 9 : Nigorikawa M, et al., "Abs # P10033: Effects of overexpression of a cellulase gene on rice development", [on line], 2009, Plant Biology, [2010年12月6日検索], インターネット <URL: <http://>

[abstracts.aspb.org/pb2009/public/P10/P10033.html](http://abstracts.aspb.org/pb2009/public/P10/P10033.html)>

非特許文献10 : Cornelissen , et al., Nucleic Acids Res. 1987, 15(17):6799-6811.

非特許文献11 : Chen, et al., Plant Mol Biol. 2006, 62(6):927-936.

非特許文献12 : Nishimura et al., Nature Protocols 2006, 1:2796-2802.

非特許文献13 : Kawazu et al., 1999, Journal of bioscience and bioengineering, 88:421-425.

非特許文献14 : Kimura et al., Applied microbiology and biotechnology, 2003, 62:374-379.

非特許文献15 : Ziegler, et al., Mol Breed. 2000, 6:37-46.

非特許文献16 : Kengen, et al., Eur J Biochem. 1993, 213:305-312.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 大量の目的のタンパク質を植物体に安定して蓄積させるためには、前記タンパク質が蓄積することによって、植物体に生育異常等の障害が生じないことが重要である。例えば、過剰発現させたタンパク質をプロテインボディやERボディに蓄積させることにより、前記タンパク質による植物体自体に対する影響を十分に低減させつつ、高濃度のタンパク質を植物体に蓄積させることが期待できる。しかしながら、プロテインボディやERボディは、それらが形成される植物種、時期、器官が限定されているため、タンパク質大量生産のための蓄積器官としては適しているとはいえない。

[0007] 本発明は、目的のタンパク質を、植物細胞や植物体に安定して蓄積させる方法、及び、タンパク質を蓄積させた形質転換植物を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、フウチョウソウ目アブラナ科植物以外の植物に対しても、*na i 2* 遺伝子を導入することによりERボディを形成し得ること、ERボディを新たに形成した植物に、細

胞内膜系移行シグナルペプチドとE R 保留シグナルペプチドを付加したタンパク質を発現させることにより、前記タンパク質をE R ボディに蓄積させられることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち、本発明は、

- (1) タンパク質を植物細胞内に蓄積させる方法であって、  
E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする遺伝子と、N末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを有し、かつC末端にE R 保留シグナルペプチドを有する標的タンパク質をコードする遺伝子とを植物細胞内に共発現させることにより、前記植物細胞内に形成されたE R ボディの内部に、前記標的タンパク質又は前記標的タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質を蓄積させる、タンパク質の植物細胞内への蓄積方法、
- (2) 前記E R ボディ形成機能を有するタンパク質が、下記(a)～(d)のいずれかから選択されるポリペプチドである前記(1)に記載のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法；
  - (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
  - (b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド、
  - (c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド、
  - (d) 配列番号1で表されるアミノ酸配列中の473番目から772番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド、
- (3) 前記標的タンパク質が、Pyk10タンパク質のC末端に他のポリペプチドを融合させたタンパク質である前記(1)又は(2)に記載のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法、
- (4) 前記植物細胞が、植物個体中の細胞である前記(1)～(3)のいずれか一つに記載のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法、

(5) E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターと標的タンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクター、又は、E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列と標的タンパク質をコードする塩基配列とを共に有する発現ベクターが導入されており、

前記標的タンパク質は、N末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを有し、かつC末端にE R 保留シグナルペプチドを有しており、

植物体中の少なくとも1の細胞において、前記細胞内に形成されたE R ボディの内部に、前記標的タンパク質又は前記標的タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質が蓄積されている形質転換植物、

(6) 前記E R ボディ形成機能を有するタンパク質が、下記(a)～(d)のいずれかから選択されるポリペプチドである前記(5)に記載の形質転換植物；

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド、

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド、

(d) 配列番号1で表されるアミノ酸配列中の473番目から772番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド、

(7) 前記標的タンパク質が、Pyk10タンパク質のC末端に他のポリペプチドを融合させたタンパク質である前記(5)又は(6)に記載の形質転換植物、

(8) 単子葉植物である前記(5)～(7)のいずれか一つに記載の形質転換植物、

(9) ユリ科植物又はイネ科植物である前記(5)～(7)のいずれか一

つに記載の形質転換植物、

(10) イネである前記(5)～(7)のいずれか一つに記載の形質転換植物、

(11) 前記(5)～(10)のいずれか一つに記載の形質転換植物の後代個体又はクローン個体である植物、  
を、提供する。

## 発明の効果

[0010] 本発明のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法により、過剰発現による植物細胞や植物個体に対する影響を十分に低減させつつ、目的のタンパク質を植物細胞内に蓄積させることができる。

また、本発明の形質転換植物は、外来タンパク質をERボディに比較的安定して蓄積させることができる。

## 図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例1及び2において、作製された各発現カセットを模式的に示した図である。

[図2]実施例1において、各発現ベクターが導入された細胞の蛍光顕微鏡の観察像である。

[図3]実施例2において、各発現ベクターが導入された細胞の蛍光顕微鏡の観察像である。

## 発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の好ましい例を説明するが、本発明はこれらの例に限定されることはない。本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。

本発明のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法は、形質転換によって新たに形成させた細胞内小器官内に、同じく形質転換によって発現させた目的のタンパク質を蓄積させることを特徴とする。具体的には、ERボディ形成機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入することにより、ERボディを前記植物細胞内に形成させ、このERボディ内に目的のタン

パク質を蓄積させる。このようなタンパク質蓄積に特化した新たな細胞内小器官を作製する技術は、現在までに報告されていない。

[0013] すなわち、本発明のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法は、タンパク質を植物細胞内に蓄積させる方法であって、E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする遺伝子（E R ボディ形成関連遺伝子）と、N末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを有し、かつC末端にE R 保留シグナルペプチドを有する標的タンパク質をコードする遺伝子とを植物細胞内に共発現させることにより、前記植物細胞内に形成されたE R ボディの内部に、前記標的タンパク質又は前記標的タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質を蓄積させることを特徴とする。E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を発現させることにより、細胞内に新たにE R ボディが形成される。また、E R ボディが形成された植物細胞内に、N末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを有し、かつC末端にE R 保留シグナルペプチドを有する標的タンパク質をコードする遺伝子を発現させると、発現されたタンパク質をE R ボディ内部に蓄積させることができる。

[0014] 本発明及び本願明細書において、遺伝子とは、タンパク質をコードする塩基配列を含み、細胞に導入されることにより、コードされたタンパク質が、細胞が備える転写・翻訳機構によって合成される核酸またはその誘導体を意味する。遺伝子は、生物が有する天然の遺伝子のみならず、遺伝子組換技術を用いて人工的に設計・合成された遺伝子も含まれる。

[0015] E R ボディ形成機能を有するタンパク質としては、シロイヌナズナの *na i 2*（配列番号1）や、*T S K - a s s o c i a t i n g p r o t e i n 1*（*T S A 1*）／*A t 1 g 5 2 4 1 0*、*A t 3 g 1 5 9 6 0*にコードされるタンパク質、及びこれらのタンパク質のホモログタンパク質等が挙げられる。*na i 2*は、N末端から順に、細胞内膜系移行シグナルペプチド（配列番号1の1～24番目の領域）と、10個のE F Eリピート（98～472番目の領域）と、*na i 2*ドメイン（473～772番目の領域）とを有している。*T S A 1*は、*na i 2*と同様に、細胞内膜系移行シグナルペプチドと

、１０個のＥＦＥリピートと、*naï2*ドメインとを有しており、アミノ酸配列で８０％の相同性を有している。*naï2*やそのホモログタンパク質等を発現させることにより、アブラナ科などを含むフウチョウソウ目以外の植物にもＥＲボディを形成させられることは、本発明者らにより初めて見出された知見である。

[0016] 本発明のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法に用いられるＥＲボディ形成機能を有するタンパク質としては、下記（ａ）～（ｄ）のいずれかから選択されるポリペプチドであることが好ましい。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（ｂ）配列番号１で表されるアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ＥＲボディ形成機能を有するポリペプチド。

（ｃ）配列番号１で表されるアミノ酸配列と８０％以上、より好ましくは９０％以上の相同性を有し、かつ、ＥＲボディ形成機能を有するポリペプチド。

なお、配列番号１で表されるアミノ酸配列とのアミノ酸配列上の相同性は、*Blast*等の公知のプログラムを用いて求めることができる。

（ｄ）配列番号１で表されるアミノ酸配列中の４７３番目から７７２番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列と８０％以上、より好ましくは９０％以上の相同性を有し、かつ、ＥＲボディ形成機能を有するポリペプチド。

[0017] ＥＲボディ形成機能を有するタンパク質（ポリペプチド）とは、植物細胞内において、前記タンパク質が発現されることにより、ＥＲボディが形成されるタンパク質である。あるポリペプチドがＥＲボディ形成機能を有するかどうかは、例えば、前記ポリペプチドをコードするＤＮＡを組み込んだ発現ベクターを、植物細胞に電気穿孔法等の公知の遺伝子導入法によって導入した後、前記植物細胞にＥＲボディが形成されたか否かを顕微鏡等で観察することにより判断することができる。

[0018] Ｎ末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドがあることにより、リボソーム

で合成されたタンパク質は、E R 内部へ移行する。また、C 末端に E R 保留シグナルペプチドがあることにより、タンパク質が E R 内部に留まることができる。すなわち、発現させたタンパク質を E R ボディの内部に蓄積させるためには、前記タンパク質の N 末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドがあり、かつ C 末端に E R 保留シグナルペプチドがあることを要する。

[0019] 本発明において、標的タンパク質が備える細胞内膜系移行シグナルペプチドとしては、E R をはじめとする細胞内膜への移行能（以下、E R 移行能ともいう）を有するペプチドであれば、特に限定されるものではなく、分泌タンパク質の N 末端に存在するシグナルペプチドの中から適宜選択して用いることができる。また、公知の細胞内膜系移行シグナルペプチドに対して、E R 移行能を損なうことなく、1 若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換若しくは付加したペプチドであってもよい。細胞内膜系移行シグナルペプチドとしては、具体的には、タバコモザイクウイルスの P r 1 a タンパク質が有する細胞内膜系移行シグナルペプチド（非特許文献 10 参照。）、シロイヌナズナの P y k 1 0（配列番号 2）が有する細胞内膜系移行シグナルペプチド（1 番目から 24 番目のアミノ酸）、シロイヌナズナの n a i 2（配列番号 1）が有する細胞内膜系移行シグナルペプチド（1 番目から 24 番目のアミノ酸）等が挙げられる。

[0020] 本発明において、標的タンパク質が備える E R 保留シグナルペプチドとしては、E R 保留能を有するペプチドであれば、特に限定されるものではなく、E R 内部に保留されるタンパク質の C 末端に存在するシグナルペプチドの中から適宜選択して用いることができる。E R 保留シグナルペプチドとしては、具体的には、アミノ酸一文字表記で K D E L や H D E L 等が挙げられる。

[0021] E R 内部に保留されるタンパク質の中には、N 末端の細胞内膜系移行シグナルペプチドの少なくとも一部が E R 内部の酵素によって切断されるものがある。本発明においても、標的タンパク質が備える細胞内膜系移行シグナルペプチドの種類によっては、標的タンパク質ではなく、標的タンパク質の N

末端領域が欠損したタンパク質が、形成されたE Rボディ内部に蓄積される。E R内部の酵素による切断部位は、標的タンパク質の種類、特に、細胞内膜系移行シグナルペプチドに連結させたポリペプチドのアミノ酸配列等により異なる。多くの場合では、細胞内膜系移行シグナルペプチドのみが切断により欠損されるが、細胞内膜系移行シグナルペプチドを含むより広いN末端領域が欠損する場合や、細胞内膜系移行シグナルペプチドの一部のみが欠損する場合もある。

[0022] 細胞内に蓄積させたい目的のタンパク質が、細胞内膜系移行シグナルペプチドやE R保留シグナルペプチドを元々備えている場合には、前記タンパク質をコードする遺伝子をE Rボディ形成関連遺伝子と共発現させることにより、前記タンパク質又は前記タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質をE Rボディ内部に蓄積させることができる。一方で、細胞内に蓄積させたい目的のタンパク質が、細胞内膜系移行シグナルペプチドやE R保留シグナルペプチドを備えていない場合には、前記タンパク質のN末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを、C末端にE R保留シグナルペプチドをそれぞれ付加したタンパク質を標的タンパク質とすることにより、前記標的タンパク質又は前記タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質をE Rボディ内部に蓄積させることができる。

[0023] 本発明においては、標的タンパク質として、N末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを元々備えるタンパク質のC末端に、細胞内に蓄積させたい目的のタンパク質にE R保留シグナルペプチドを付加させたタンパク質を、直接又は適当なスペーサーを介して融合させたキメラタンパク質であってもよい。例えば、Pyk10のC末端に他のポリペプチドを融合させたタンパク質を標的タンパク質とすることができる。

[0024] 植物細胞にE Rボディ形成機能を有するタンパク質と標的タンパク質とを共発現させる方法は、特に限定されるものではなく、前記技術分野において公知のいずれの方法で行ってもよい。例えば、E Rボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターと標的タンパク質を

コードする塩基配列を有する発現ベクターとを、植物細胞に導入することにより、E R ボディ形成機能を有するタンパク質と標的タンパク質とを共発現させた形質転換細胞を作製することができる。E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列と標的タンパク質をコードする塩基配列とを共に有する発現ベクターを導入してもよい。

[0025] E R ボディ形成関連遺伝子と標的タンパク質をコードする遺伝子とを共発現させる植物細胞は、植物個体中の細胞であってもよく、植物個体から採取された細胞であってもよく、脱分化処理等の処理が施された細胞であってもよく、培養細胞であってもよい。脱分化処理により得られたカルスに、E R ボディ形成関連遺伝子と標的タンパク質をコードする遺伝子とを導入することにより、形成されたE R ボディの内部に標的タンパク質又は標的タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質が蓄積された細胞を有する植物個体を得ることができる。

[0026] 本発明において、E R ボディ形成関連遺伝子と標的タンパク質をコードする遺伝子とを共発現させる植物細胞の種類は、植物であれば特に限定されるものではないが、野生型ではE R ボディが形成されていない植物種の細胞であることが好ましい。中でも、単子葉植物であることが好ましく、ユリ科植物又はイネ科植物であることがより好ましい。ユリ科の植物として、例えば、タマネギ等が挙げられる。また、イネ科の植物として、例えば、イネ、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、オオムギ、ライムギ、ヒエ、エリアンサス、サトウキビ、スイッチグラス、ミスカンサス、ネピアグラス等が挙げられる。

[0027] E R ボディ形成機能を有するタンパク質や標的タンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターは、これらのタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを、周知の遺伝子組換え技術を用いて発現ベクターに組み込むことにより作製することができる。市販の発現ベクター作製キットを用いてもよい。

[0028] 発現ベクターとしては、植物細胞において転写が可能なプロモーター配列

と、ポリアデニレーション部位を含むターミネーター配列を有する発現ベクターであって、植物細胞に導入した場合に、組み込まれたポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを発現させることが可能なベクターであれば特に限定されるものではない。形質転換植物細胞や形質転換植物の作製のために通常用いられる任意の発現ベクターを用いることができる。ERボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列と標的タンパク質をコードする塩基配列とを一の発現ベクターに組み込む場合には、両タンパク質が独立して細胞内に発現されるように、プロモーター配列を有するDNA、ERボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNA、ターミネーター配列を有するDNAからなる発現用カセットと、プロモーター配列を有するDNA、標的タンパク質をコードする塩基配列を有するDNA、ターミネーター配列を有するDNAからなる発現用カセットとを備えていることが必要である。

[0029] 発現ベクターとしては、例えば、MultiRound Gateway（非特許文献11参照。）エントリーベクターや、pIG121、pIG121Hm等のバイナリーベクター等がある。使用可能なプロモーターとして、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sのプロモーター、トウモロコシubi1のプロモーター等がある。また、使用可能なターミネーターとして、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター等がある。その他、組織や器官に特異的なプロモーターを用いてもよい。例えば、葉特異的な発現プロモーターとして、イネrbcsのプロモーター等が挙げられる。このような組織又は器官特異的なプロモーターを用いることにより、植物全体ではなく、特定の組織や器官にのみ標的タンパク質を発現させることができる。

例えば、食用植物にERボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターと標的タンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターとを導入して形質転換植物を作製した場合に、前記形質転換植物の非食用部分にのみ標的タンパク質を発現させることができる。

[0030] 前記発現ベクターは、E R ボディ形成機能を有するタンパク質や標的タンパク質をコードする塩基配列を有するDNAのみならず、薬剤耐性遺伝子等も組み込まれた発現ベクターであることが好ましい。発現ベクターにより形質転換された植物と形質転換されていない植物の選抜を容易に行うことができるためである。前記薬剤耐性遺伝子として、例えば、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子等がある。

[0031] 本発明において、発現ベクターを用いて形質転換植物を作製する方法は、特に限定されるものではなく、形質転換植物細胞や形質転換植物を作製する場合に通常用いられている方法により行うことができる。前記方法として、例えば、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、及びPEG（ポリエチレングリコール）法等がある。このうち、アグロバクテリウム法で行うことが好ましい。形質転換植物細胞や形質転換植物は、薬剤耐性等を指標として選抜することができる。また、宿主として、植物培養細胞を用いてもよく、植物器官や植物組織を用いてもよい。

[0032] 周知の植物組織培養法等を用いることにより、形質転換された植物細胞やカルス等から形質転換植物を得ることができる。例えば、形質転換植物細胞を、ホルモンフリーの再分化培地等を用いて培養して、得られた発根した幼植物体を土壌等に移植して栽培することにより、形質転換植物を得ることができる。

[0033] 例えば、E R ボディ形成関連遺伝子と標的タンパク質をコードする遺伝子とを共発現させるように形質転換させたイネは、E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターと標的タンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターとを、Nishimuraらの方法（非特許文献12参照。）等の常法により形質転換することにより作成することができる。具体的には、例えば、外皮を除去した後表面殺菌した完熟種子を培養して得られたカルスを、E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターと標的タンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターとにより形質転換されたアグロバクテリウムの溶液に

浸漬して感染させる。その後、抗生物質等を用いて形質転換されたカルスを選抜する。これにより、本発明の形質転換植物であるイネを得ることができる。

[0034] このようにして得られた本発明の形質転換植物は、形質転換前の植物個体と同様に栽培したり、挿し木をしたり、交配等により後代個体を得ることができる。また、公知のクローニング技術によりクローン個体を得ることもできる。

[0035] 本発明の形質転換植物では、タンパク質蓄積器官として新たに形成されたERボディ内に標的タンパク質又は標的タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質が蓄積されている。このため、標的タンパク質等を、例えば液胞に存在するタンパク質分解酵素などから保護し、安定的に蓄積することができる。同時に、標的タンパク質等が他の細胞内小器官、ひいては植物の成長に与える悪影響を十分に低減させることができる。

[0036] 本発明の形質転換植物からは、新たに形成されたERボディ内に蓄積されている標的タンパク質又は標的タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質を回収することができる。本発明の形質転換植物から標的タンパク質等を回収する方法としては、特に限定されるものではなく、細胞や生体組織から組換えタンパク質を抽出・精製する場合に通常用いられている方法の中から適宜選択して行うことができる。前記方法として、例えば、Kawazuらの方法（非特許文献13参照。）や、Kimuraらの方法（非特許文献14参照。）等がある。

[0037] また、本発明のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法における標的タンパク質として、*Acidothermus cellulolyticus*由来エンドグルカナーゼE1遺伝子触媒領域（E1-cat）（非特許文献15参照。）や*Pyrococcus furiosus*由来β-グルコシダーゼCelB遺伝子（非特許文献16参照。）等の超好熱性グルカナーゼのような、植物細胞壁由来のセルロースを糖に加水分解する糖化酵素を用いることにより、バイオエタノール生産に好適なバイオマス原料となる形質転換

植物を作製することができる。得られた形質転換植物において、糖化酵素は形質転換植物内のERボディに蓄積されているため、形質転換の際に宿主となった植物と同様に栽培することができる。その上、前記形質転換植物をバイオマス原料とする場合には、バイオエタノール生産のための前処理に供することにより、ERボディから蓄積されている糖化酵素が放出される結果、前記形質転換植物中のセルロースが分解されやすくなる。

## 実施例

[0038] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

### [実施例 1]

[0039] タマネギ表皮細胞に、*na i 2* 遺伝子と標的タンパク質をコードする遺伝子を一過性に共発現させることにより、新たに形成されたERボディに標的タンパク質を蓄積させた。

### <遺伝子発現ベクターの作製>

レポーターであるオワンクラゲ蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を、単独、若しくは糖化酵素である *Acidothermus cellulosilyticus* 由来エンドグルカナーゼ E1 遺伝子触媒領域 (E1-cat) (非特許文献 15 参照。) 又は *Pyrococcus furiosus* 由来  $\beta$ -グルコシダーゼ CelB 遺伝子 (非特許文献 16 参照。) との融合タンパク質として、トウモロコシ *ubi1* プロモーター及びアグロバクテリウム *nos* ターミネーターと PCR 法により連結し、遺伝子発現カセットを作製した。

各遺伝子のコード領域 5' 末端にはタバコモザイクウイルス *Pr1a* タンパク質シグナルペプチド (非特許文献 10 参照。) を付加し、コード領域 3' 末端には ER 保留シグナルペプチドであるアミノ酸 4 残基 (HDEL) を付加した。また、トウモロコシ *ubi1* プロモーター、GFP 遺伝子、及びアグロバクテリウム *nos* ターミネーターを PCR 法により連結し、細胞内膜系移行シグナルペプチドと ER 保留シグナルペプチドのいずれも含まない遺伝子

発現カセット（GFP発現カセット）を作製した。さらに、シロイヌナズナERボディ形成関連遺伝子である*na i 2* 遺伝子の発現カセット（*na i 2* 発現カセット）を同様に作製した。

[0040] 図1は、作製された各発現カセットを模式的に示した図である。図1中、「P u b i 1」はトウモロコシ*u b i 1*プロモーターを、「T n o s」はアグロバクテリウム*n o s*ターミネーターを、「H D E L」はER保留シグナルペプチドを、「S P」はタバコモザイクウイルスP r 1 aタンパク質シグナルペプチドを、「G F P」はGFPを、「E 1」はE 1-c a tを、「C e l B」はC e l Bを、それぞれ示す。

[0041] これらの発現カセットを、I n - F u s i o n A d v a n t a g e P C R クローニングキット（クロンテック社製）を用いてM u l t i R o u n d G a t e w a y（非特許文献11参照。）エントリーベクターに挿入し、発現ベクターを作製した。

[0042] <パーティクルガン法による遺伝子導入>

作製した発現ベクターを、遺伝子組み換え装置（パーティクルガン）（製品名：P D S - 1 0 0 0 / H e、B i o - R a d 社製）を用いて、インストラクションマニュアルに従ってタマネギ鱗茎に導入した。

[0043] <発現ベクターを導入した細胞の観察>

発現ベクターを導入した細胞は、蛍光実体顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡により観察した。具体的には、GFPの蛍光を検出することにより、細胞中に発現しているGFP又はGFP融合タンパク質の局在を観察した。蛍光実体顕微鏡画像を図2に示す。図2中、上段（*na i 2* 共発現なし）は、*na i 2* 発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入しなかった細胞の画像であり、下段（*na i 2* 共発現あり）は、*na i 2* 発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入した細胞の画像である。

[0044] この結果、細胞内膜系移行シグナルペプチドとER保留シグナルペプチドのいずれも含まないGFP発現カセットを含む発現ベクターを導入した細胞では、*na i 2* 発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入したか否かに

かわらず、GFPは細胞質全体に局在していた（図示せず。）。これに対して、細胞内膜系移行シグナルペプチドとER保留シグナルペプチドをいずれも備えているSP-GFP-HDEL発現カセット、SP-E1::GFP-HDEL融合発現カセット、及びSP-Ce1B::GFP-HDEL融合発現カセットを含む発現ベクターを導入した細胞では、nai2発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入しなかった場合には、各GFP又はGFP融合タンパク質はER全体に分散して局在していたが、nai2発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入した細胞では、楕円状で強い蛍光強度を示す細胞内小器官に局在していた。この細胞内小器官はERボディであり、nai2と細胞内膜系移行シグナルペプチドとER保留シグナルペプチドを備えるタンパク質とを共発現させることにより、新たにERボディが形成し、細胞内膜系移行シグナルペプチドとER保留シグナルペプチドを備えるタンパク質をERボディに蓄積させられることが示された。

#### [実施例2]

[0045] Pyk10タンパク質のC末端に他のポリペプチドを融合させたタンパク質を標的タンパク質として、本発明のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法により、タマネギ表皮細胞に、ERボディを形成させて標的タンパク質を蓄積させた。

#### <遺伝子発現ベクターの作製>

Pyk10のC末端にGFPを連結させた融合タンパク質として、トウモロコシubi1プロモーター及びアグロバクテリムnosターミネーターとPCR法により連結し、遺伝子発現カセットを作製した。前記遺伝子のコード領域3'末端にはER保留シグナルペプチドであるアミノ酸4残基（HDEL）を付加した。なお、前述のとおり、Pyk10のN末端には細胞内膜系移行シグナルペプチドが元々備わっている。作製された発現カセット（Pyk10::GFP-HDEL融合発現カセット）の模式図を図1に示す。

Pyk10::GFP-HDEL融合発現カセットを、In-Fusion Advantage PCRクローニングキット（クロンテック社製）

を用いてMultiRound Gateway（非特許文献11参照。）  
エントリーベクターに挿入し、発現ベクターを作製した。

[0046] <パーティクルガン法による遺伝子導入及び発現ベクターを導入した細胞の観察>

実施例1と同様にして、Pyk10::GFP-HDEL融合発現カセットを含む発現ベクター、実施例1で用いたSP-GFP-HDEL発現カセットを含む発現ベクター、又は、細胞内膜系移行シグナルペプチドとER保留シグナルペプチドのいずれも含まないGFP発現カセットを含む発現ベクター、並びにnai2発現カセットを含む発現ベクターを、それぞれタマネギ鱗茎に導入した。さらに、実施例1と同様にして、発現ベクターを導入した細胞は、蛍光実体顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡により観察した。蛍光実体顕微鏡画像を図3に示す。図3中、上段（nai2共発現なし）は、nai2発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入しなかった細胞の画像であり、下段（nai2共発現あり）は、nai2発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入した細胞の画像である。

[0047] この結果、nai2発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入しなかった場合には、SP-GFP-HDEL発現カセットを含む発現ベクターを導入した細胞とPyk10::GFP-HDEL融合発現カセットを含む発現ベクターを導入した細胞のいずれも、GFP蛍光はER全体に観察された。これに対して、SP-GFP-HDEL発現カセットを含む発現ベクターとnai2発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入させた場合には、GFP蛍光が認められた細胞、すなわち遺伝子が導入された細胞の約半数でERボディの形成が認められた。一方、Pyk10::GFP-HDEL融合発現カセットを含む発現ベクターとnai2発現カセットを含む発現ベクターを同時に導入させた場合には、GFP蛍光が認められた細胞のほぼ全てでERボディの形成が認められた。細胞内膜系移行シグナルペプチドとER保留シグナルペプチドのいずれも含まないGFP発現カセットを含む発現ベクターを導入した細胞では、実施例1と同様、nai2発現カセットを含む

発現ベクターを同時に導入したか否かにかかわらず、GFPは細胞質全体に局在していた。以上の結果から、目的タンパク質をPyk10と融合して発現させると共に、nai2を同時に発現させる事により、高頻度で細胞内にERボディを形成させることが可能であることが示された。

### 産業上の利用可能性

[0048] 本発明は、目的のタンパク質を、植物細胞や植物体に安定して蓄積させる方法、及び、タンパク質を蓄積させた形質転換植物を提供することができる。本発明のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法により、過剰発現による植物細胞や植物個体に対する影響を十分に低減させつつ、目的のタンパク質を植物細胞内に蓄積させることができるため、前記方法や、それにより得られる本発明の形質転換植物は、例えばタンパク質の大量生産や植物の形質改変等の分野において利用が可能である。

## 請求の範囲

- [請求項1]           タンパク質を植物細胞内に蓄積させる方法であって、  
E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする遺伝子と、N 末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを有し、かつC 末端にE R 保留シグナルペプチドを有する標的タンパク質をコードする遺伝子とを植物細胞内に共発現させることにより、前記植物細胞内に形成されたE R ボディの内部に、前記標的タンパク質又は前記標的タンパク質のN 末端領域が欠損したタンパク質を蓄積させる、タンパク質の植物細胞内への蓄積方法。
- [請求項2]           前記E R ボディ形成機能を有するタンパク質が、下記（a）～（d）のいずれかから選択されるポリペプチドである請求項1 に記載のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法。
- （a）配列番号1 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- （b）配列番号1 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド。
- （c）配列番号1 で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド。
- （d）配列番号1 で表されるアミノ酸配列中の473 番目から772 番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド。
- [請求項3]           前記標的タンパク質が、Pyk10 タンパク質のC 末端に他のポリペプチドを融合させたタンパク質である請求項1 又は2 に記載のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法。
- [請求項4]           前記植物細胞が、植物個体中の細胞である請求項1 ～3 のいずれか一項に記載のタンパク質の植物細胞内への蓄積方法。
- [請求項5]           E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する発現ベクターと標的タンパク質をコードする塩基配列を有する発

現ベクター、又は、E R ボディ形成機能を有するタンパク質をコードする塩基配列と標的タンパク質をコードする塩基配列とを共に有する発現ベクターが導入されており、  
前記標的タンパク質は、N末端に細胞内膜系移行シグナルペプチドを有し、かつC末端にE R 保留シグナルペプチドを有しており、  
植物体中の少なくとも1の細胞において、前記細胞内に形成されたE R ボディの内部に、前記標的タンパク質又は前記標的タンパク質のN末端領域が欠損したタンパク質が蓄積されている形質転換植物。

[請求項6] 前記E R ボディ形成機能を有するタンパク質が、下記(a)～(d)のいずれかから選択されるポリペプチドである請求項5に記載の形質転換植物。

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド。

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有し、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド。

(d) 配列番号1で表されるアミノ酸配列中の473番目から772番目のアミノ酸からなるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有し、かつ、E R ボディ形成機能を有するポリペプチド。

[請求項7] 前記標的タンパク質が、Pyk10タンパク質のC末端に他のポリペプチドを融合させたタンパク質である請求項5又は6に記載の形質転換植物。

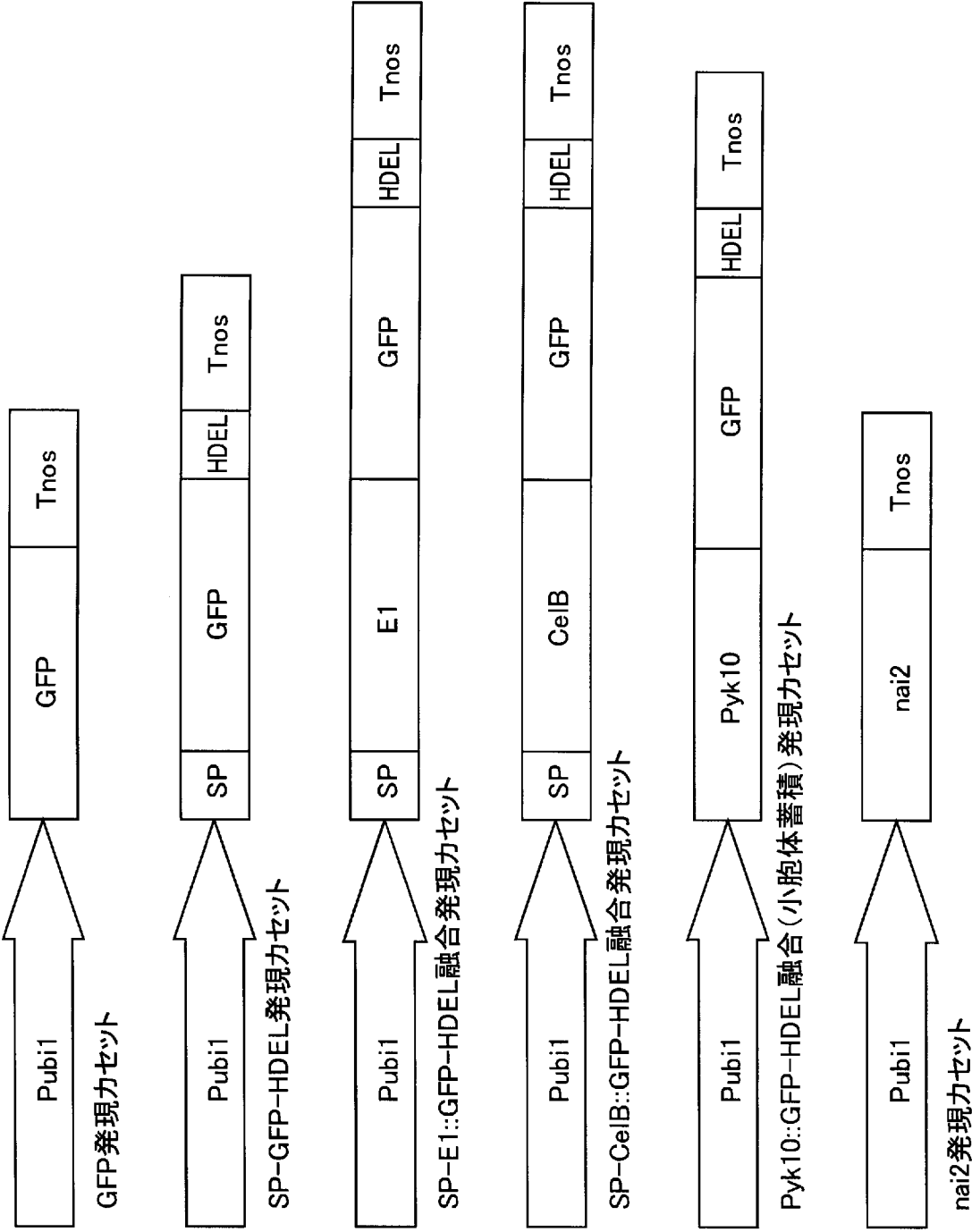
[請求項8] 単子葉植物である請求項5～7のいずれか一項に記載の形質転換植物。

[請求項9] ユリ科植物又はイネ科植物である請求項5～7のいずれか一項に記載の形質転換植物。

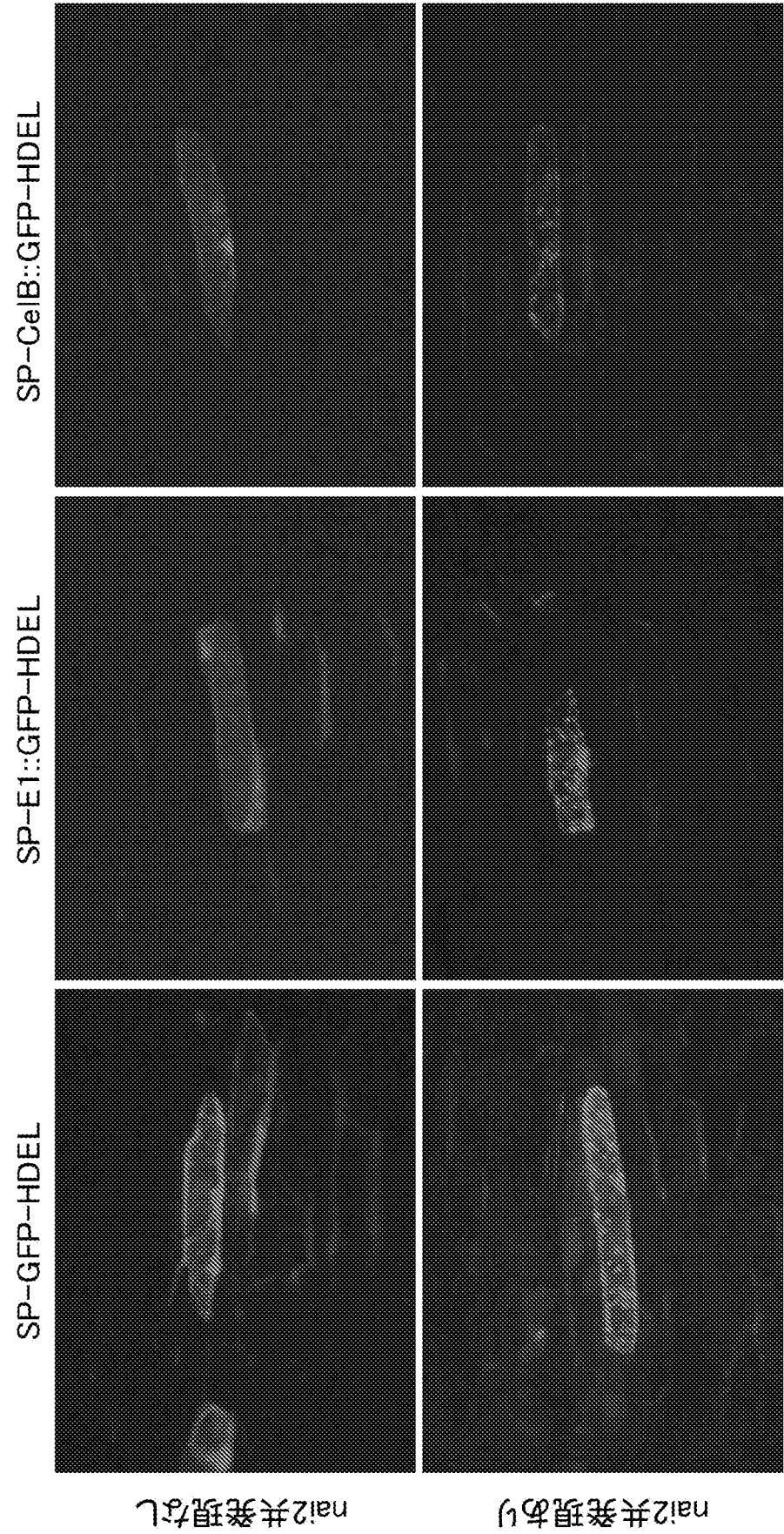
[請求項10] イネである請求項5～7のいずれか一項に記載の形質転換植物。

[請求項11]           請求項5～10のいずれか一項に記載の形質転換植物の後代個体又はクローン個体である植物。

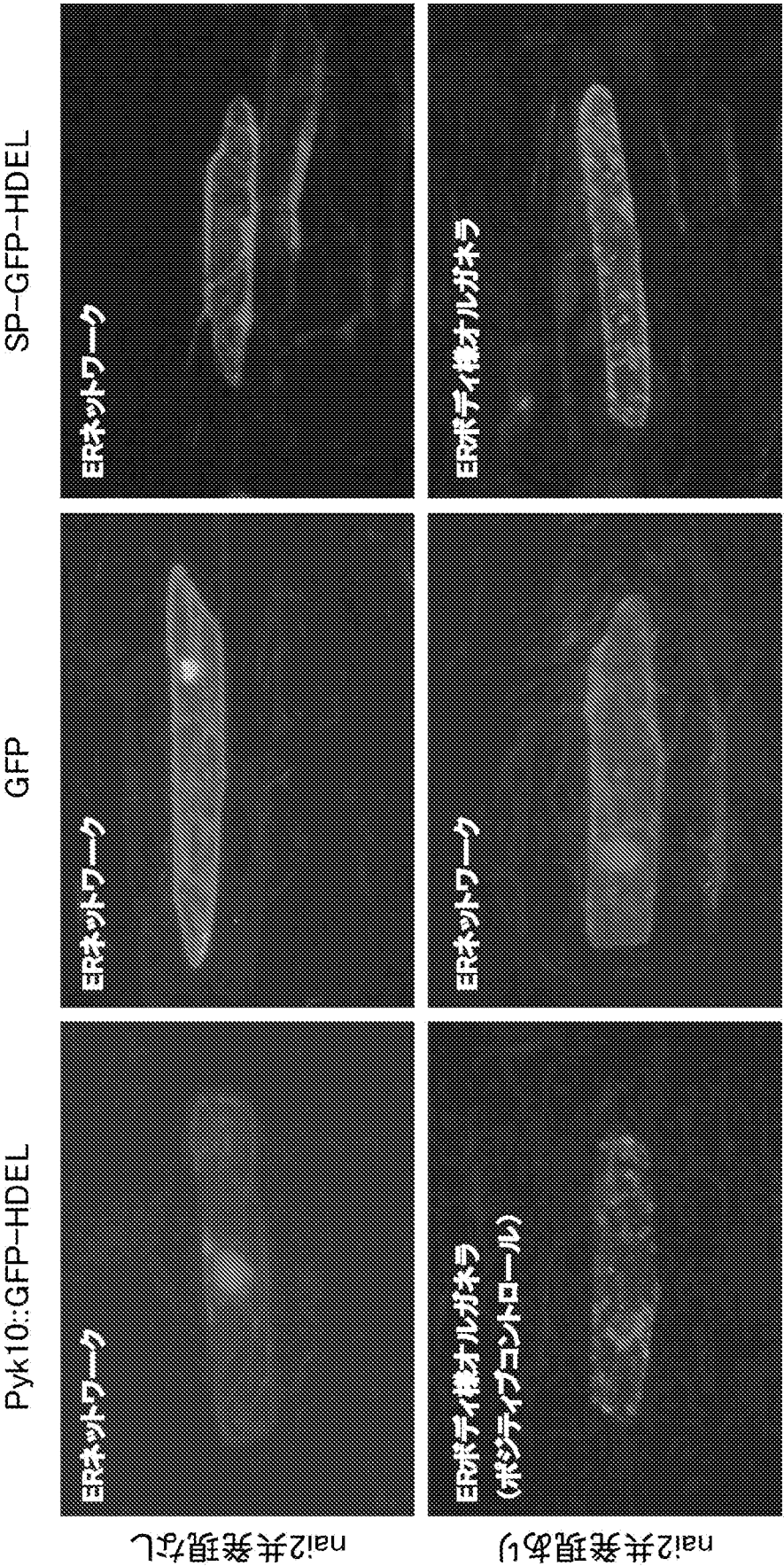
[図1]



[図2]



[図3]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054122

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H5/00(2006.01)i, A01G16/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H5/00, A01G16/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y/A       | Kenji YAMADA et al., "NAI2 to PYK10 wa ER Body no Keisei to ER Body Maku Tanpakushitsu no Kyokuzai o Seigyo suru", Proceedings of the Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 2010, vol.51 <sup>st</sup> , page 156, 3aH11(220) | 1, 3-5, 7-11/<br>2, 6 |
| Y/A       | WO 2009/158716 A1 (Donald Danforth Plant Science Center),<br>30 December 2009 (30.12.2009),<br>& US 2010/0313307 A1 & EP 2307547 A1<br>& WO 2009/158694 A1 & JP 2011-526155 A                                                                          | 1, 3-5, 7-11/<br>2, 6 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 March, 2012 (08.03.12)

Date of mailing of the international search report

19 March, 2012 (19.03.12)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054122

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P, Y      | WO 2011/118058 A1 (Inter-University Research Institute Corporation National Institutes of Natural Sciences),<br>29 September 2011 (29.09.2011),<br>(Family: none)                                                   | 1-11                  |
| A         | Kenji YAMADA et al., "Mechanisms of endoplasmic reticulum body formation in Arabidopsis thaliana", Journal of Japanese Biochemical Society, 2009, abstract CD, page ROMBUNNO. 4S1A-6                                | 1-11                  |
| A         | YAMADA, K et al., NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in Arabidopsis thaliana. Plant Cell. 2008 Sep, vol.20(9), pp.2529-2540                                             | 1-11                  |
| A         | YAMADA, K et al., The ER body, a new organelle in Arabidopsis thaliana, requires NAI2 for its formation and accumulates specific beta-glucosidases. Plant Signal Behav. 2009 Sep, vol.4(9), pp.849-852              | 1-11                  |
| A         | HERMAN, E et al., Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. Plant Physiol. 2004 Nov, vol.136(3), pp.3440-3446 | 1-11                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01H5/00(2006.01)i, A01G16/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01H5/00, A01G16/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 2 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 2 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 2 年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                          | 関連する<br>請求項の番号        |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y/<br>A         | 山田健志ら, NAI2 と PYK10 は ER ボディの形成と ER ボディ膜タンパク質の局在を制御する, 日本植物生理学会年会要旨集, 2010, vol. 51 <sup>st</sup> , p. 156, 3aH11 (220)                                    | 1, 3-5, 7-11/<br>2, 6 |
| Y/<br>A         | WO 2009/158716 A1 (Donald Danforth Plant Science Center)<br>2009. 12. 30<br>& US 2010/0313307 A1 & EP 2307547 A1<br>& WO 2009/158694 A1 & JP 2011-526155 A | 1, 3-5, 7-11/<br>2, 6 |

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 8 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4 N

9 1 2 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                              |                |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                            | 関連する<br>請求項の番号 |
| P, Y                  | WO 2011/118058 A1 (大学共同利用機関法人自然科学研究機構)<br>2011.09.29 (ファミリーなし)                                                                                                                                                               | 1-11           |
| A                     | 山田健志ら, シロイヌナズナにおける小胞体由来のオルガネラ ER ボ<br>ディの形成機構, 生化学, 2009, 抄録 CD Page. ROMBUNNO. 4S1A-6                                                                                                                                       | 1-11           |
| A                     | YAMADA, K et al., NAI2 is an endoplasmic reticulum body component<br>that enables ER body formation in Arabidopsis thaliana.<br>Plant Cell. 2008 Sep, vol.20(9), pp.2529-2540                                                | 1-11           |
| A                     | YAMADA, K et al., The ER body, a new organelle in Arabidopsis<br>thaliana, requires NAI2 for its formation and accumulates<br>specific beta-glucosidases.<br>Plant Signal Behav. 2009 Sep, vol.4(9), pp.849-852              | 1-11           |
| A                     | HERMAN, E et al., Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking<br>of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway<br>for protein transfer to the vacuole.<br>Plant Physiol. 2004 Nov, vol.136(3), pp.3440-3446 | 1-11           |