

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6350995号
(P6350995)

(45) 発行日 平成30年7月4日(2018.7.4)

(24) 登録日 平成30年6月15日(2018.6.15)

(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	15/83	(2006.01)	C 1 2 N	15/83	Z
A O 1 H	1/00	(2006.01)	A O 1 H	1/00	A
A O 1 H	5/00	(2018.01)	A O 1 H	5/00	A

請求項の数 12 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2015-501506 (P2015-501506)	(73) 特許権者	301021533
(86) (22) 出願日	平成26年2月20日 (2014.2.20)		国立研究開発法人産業技術総合研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/054083		東京都千代田区霞が関1-3-1
(87) 国際公開番号	W02014/129560	(73) 特許権者	504173471
(87) 国際公開日	平成26年8月28日 (2014.8.28)		国立大学法人北海道大学
審査請求日	平成28年8月8日 (2016.8.8)		北海道札幌市北区北8条西5丁目
(31) 優先権主張番号	特願2013-31355 (P2013-31355)	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成25年2月20日 (2013.2.20)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
(出願人による申告)平成24年度、経済産業省「エネルギー使用合理化技術開発等委託費(密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物ものづくり実証研究開発)」		(74) 代理人	100087871
、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物において外来遺伝子を発現させるための核酸分子及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

外来遺伝子を発現させるための植物と核酸分子とのセットであって、
キュウリモザイクウイルス(CMV)の2bタンパク質を機能的に発現するように形質転換された植物、並びに、

アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の右境界配列(RB)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、2bタンパク質をコードする遺伝子の一部又は全部が前記外来遺伝子に置換されたCMVのRNA2ゲノムに相当する配列、及び、アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の左境界配列(LB)をこの順序で有する第1の核酸分子を含むセット。

【請求項2】

第1の核酸分子が、CMVのRNA2ゲノムに相当する配列とアグロバクテリウムのT-DNA配列由来の左境界配列(LB)との間に、前記植物内で機能するターミネーター配列を有する、請求項1に記載のセット。

【請求項3】

第1の核酸分子が、T-DNAベクターの形態である、請求項1又は2に記載のセット。

【請求項4】

前記植物が、CMVの2bタンパク質に加えて、更にCMVのRNA1ゲノム及び/又はRNA3ゲノムを機能的に発現するように形質転換された植物である、請求項1~3の

何れか一項に記載のセット。

【請求項 5】

アグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の右境界配列 (R B)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、CMV の RNA 1 ゲノムに相当する配列、及びアグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の左境界配列 (L B) をこの順序で有する第 2 の核酸分子、及び/又は、

アグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の右境界配列 (R B)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、CMV の RNA 3 ゲノムに相当する配列、及びアグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の左境界配列 (L B) をこの順序で有する第 3 の核酸分子
を更に含む、1 ~ 4 の何れか一項に記載のセット。

10

【請求項 6】

前記第 1 及び/又は第 2 の核酸分子が、CMV の RNA 2 ゲノムに相当する配列とアグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の左境界配列 (L B) との間に、前記植物内で機能するターミネーター配列を有する、請求項 5 に記載のセット。

【請求項 7】

前記第 1 及び/又は第 2 の核酸分子が、T - DNA ベクターの形態である、請求項 5 又は 6 に記載のセット。

【請求項 8】

外来遺伝子を発現させるための方法であって、

(1) キュウリモザイクウイルス (C M V) の 2 b タンパク質を機能的に発現するように形質転換されてなる植物を育成する工程、

20

(2) アグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の右境界配列 (R B)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、2 b タンパク質をコードする遺伝子の一部又は全部が前記外来遺伝子に置換された CMV の RNA 2 ゲノムに相当する配列、及び、アグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の左境界配列 (L B) をこの順序で有する第 1 の核酸分子を、前記植物に導入する工程、及び、

(3) 前記第 1 核酸分子が導入された前記植物を栽培して、前記第 1 核酸分子に組み込まれた外来遺伝子を発現させる工程を含む方法。

【請求項 9】

前記 (2) の工程における前記第 1 の核酸分子の植物への導入が、第 1 の核酸分子を含む溶液の植物への浸透又は注入により行われる、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記 (1) の工程において育成される植物が、CMV の 2 b タンパク質に加えて、更に CMV の RNA 1 ゲノム及び/又は RNA 3 ゲノムを機能的に発現するように形質転換された植物である、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 (2) の工程において、前記第 1 の核酸分子と共に、

アグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の右境界配列 (R B)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、CMV の RNA 1 ゲノムに相当する配列、及びアグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の左境界配列 (L B) をこの順序で有する第 2 の核酸分子、及び/又は、

40

アグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の右境界配列 (R B)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、CMV の RNA 3 ゲノムに相当する配列、及びアグロバクテリウムの T - DNA 配列由来の左境界配列 (L B) をこの順序で有する第 3 の核酸分子
を植物に導入する、請求項 8 ~ 10 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 (2) の工程における第 2 及び/又は第 3 の核酸分子の植物への導入が、第 2 及び/又は第 3 の核酸分子を含む溶液の植物への浸透又は注入により行われる、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物において外来遺伝子を発現させるための核酸分子及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

植物において目的遺伝子を1～2週間程度で発現させることが可能な一過性発現法は、植物を利用した物質生産法として有力な手段である。

【0003】

従来、植物における一過性発現法は、(1)アグロインフィルトレーション法、(2)植物ウイルスベクター法、(3)m a g n I C O N (登録商標)システム、及び(4)パーティクル・ガン法に大別される。

【0004】

(1)アグロインフィルトレーション法は、目的遺伝子を挿入したT-DNAベクターで形質転換したアグロバクテリウムの培養液を、物理的手法(シリンジ等による注入や減圧等による浸透などの手法)で植物組織内に導入し、植物に感染させることにより、目的遺伝子を植物に一過性発現させる手法である(非特許文献1:Grimsley N., Hohn B., Hohn T., and Walden R., (1986), "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid an alternative route for viral infection of plants by using the Ti Plasmid., Proc Natl Acad Sci USA, 83(10):3282-6)。この手法によれば、感染能の強いアグロバクテリウムを植物体の全身に物理的手法(注入又は浸透)で普く移行させて感染させ、植物の全組織で一様に目的遺伝子を発現させることができる。しかし、その各細胞における発現量は、アグロバクテリウムの感染能力及び導入した遺伝子の発現調節配列(プロモーター及びターミネーター)の能力により制限されてしまい、植物体全体としての発現レベルを向上させることは困難であった。

【0005】

(2)植物ウイルスベクター法は、目的遺伝子を挿入した植物ウイルスゲノムのcDNAを試験管内転写し、得られたRNAをベクターとして植物に接種して感染させ、ウイルス自身の増殖能及び全身移行能を利用して、目的遺伝子を植物に発現させる手法である。斯かる植物ウイルスベクターの例としては、本発明者等の開発したキュウリモザイクウイルス(CMV)ベクター(特許文献1:特許第4009663号公報)や、タバコモザイクウイルス(TMV)ベクター(非特許文献2:Takamatsu N, Ishikawa M, Meshi T, and Okada Y., (1987), Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA, EMBO J., 6(2):307-11)、ジャガイモXウイルス(PVX)ベクター(非特許文献3:Baulcombe, D.C., Chapman, S., and Santa Cruz, S., (1995), Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infectious, Plant J., 7:1045-1053)等が挙げられる。この手法は、ウイルスの自己複製能を利用して目的遺伝子を発現させるため、特に増殖能の高いCMVやTMVに基づくベクターを使用すれば、植物細胞当たりの目的遺伝子の発現量を高めることができる。しかし、植物体の各組織細胞への移行性はウイルスの移行能力に依存するため、植物体全体の細胞にウイルスベクターを感染させ、目的遺伝子を発現させることは極めて困難である。その結果、ベクター導入後の植物体は、ウイルスが移行し、目的遺伝子を発現する細胞と、ウイルスが移行せず、目的遺伝子を発現しない細胞とのキメラ(モザイク)状態になってしまう。よって、植物体全体としての発現レベルを向上させることはやはり困難であった。

【0006】

(3)m a g n I C O N (登録商標)システムは、目的遺伝子を挿入したTMV又はPVXゲノムのcDNAをT-DNAベクター内に導入し、得られたT-DNAベクターで形質転換したアグロバクテリウムの培養液を、物理的手法(シリンジ等による注入又は減圧による浸透)で植物組織内に導入し、植物に感染させることにより、目的遺伝子を植物に一過性発現させる手法である(特許文献2:特開2007-510423号公報;特許文

10

20

30

40

50

献3：特開2008-535473号公報；特許文献4：特開2011-024591号公報）。すなわち、ベクターを植物体の全身に物理的手法（注入又は浸透）で行き渡らせて感染させ、植物の全組織で目的遺伝子を発現させることができる。また、ウイルス（TMV又はPVX）の自己複製能を利用して目的遺伝子を発現させるため、植物細胞当たりの目的遺伝子の発現量を高めることができる。このように、本手法は、上述の（1）アグロインフィルトレーション法及び（2）植物ウイルスベクター法の利点を兼ね備えた手法である。しかし、ベースとなる植物ウイルスは、増殖能の高い単独一本鎖RNAをゲノムとするTMV又はPVXに限られるため、感染可能な宿主植物が非常に制限されてしまうという課題があった。また、発現対象の目的遺伝子に加えて、ウイルス（TMV又はPVX）の複製に必要な全ての遺伝子が一本鎖RNA上に配置されるために、導入可能な目的遺伝子のサイズが制限されてしまうという課題があった。

10

【0007】

（4）パーティクル・ガン（パーティクル・ボンバードメント）法は、核酸で被覆した金属微粒子を高速で射出することにより、目的遺伝子を細胞内に導入する手法である（非特許文献4：Christou P, (1995), Particle bombardment, Methods Cell Biol., 50:375-82）。種々の生物種や組織に簡便に使用できるが、実施に斯かる費用が比較的高価である上に、目的遺伝子が導入時に分断されたり、植物細胞中に導入される細胞比率が極端に低いため、実用的ではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0008】

【特許文献1】特許第4009663号公報

【特許文献2】特開2007-510423号公報

【特許文献3】特開2008-535473号公報

【特許文献4】特開2011-024591号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Grimsley N., Hohn B., Hohn T., and Walden R., (1986), "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid an alternative route for viral infection of plants by using the Ti Plasmid., Proc Natl Acad Sci USA, 83(10):3282-6

30

【非特許文献2】Takamatsu N, Ishikawa M, Meshi T, and Okada Y., (1987), Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA, EMBO J., 6(2):307-11

【非特許文献3】Baulcombe, D.C., Chapman, S., and Santa Cruz, S., (1995), Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infectious, Plant J., 7:1045-1053

【非特許文献4】Christou P, (1995), Particle bombardment, Methods Cell Biol., 50:375-82

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

以上の背景から、植物体の全身移行能に優れると共に、用いた植物体のほとんどの細胞で目的遺伝子を高レベルで発現させることができ、更には宿主植物の種類や導入可能な目的遺伝子サイズの自由度も高い、優れた一過性発現法が求められていた。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者等は上記課題に鑑み鋭意検討した結果、2bタンパク質をコードする遺伝子の一部又は全部が外来遺伝子に置換されたキュウリモザイクウイルス（CMV）のRNA2ゲノムに相当する配列を、アグロバクテリウムのT-DNA配列と機能的に組み合わせた

50

核酸分子を、別途CMVのRNA1ゲノム及びRNA3ゲノム並びにタンパク質2bを機能的に発現する宿主植物に導入し、当該植物を栽培して外来遺伝子を発現させることにより、植物体の全身の細胞に外来遺伝子を普く移行させて発現させることができるとともに、各細胞での外来遺伝子の発現効率を高め、植物体全体として高発現を達成することができることを見出した。また、本手法によれば、TMVやPVXを用いた上述のmagnICON（登録商標）システムと比べて、宿主植物の種類や導入可能な外来遺伝子サイズの自由度が遥かに高まることを見出し、本発明に到達した。

【0012】

即ち、本発明の主旨は、以下に存する。

(1) 植物において外来遺伝子を発現させるための核酸分子であって、アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の右境界配列(RB)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、2bタンパク質をコードする遺伝子の一部又は全部が前記外来遺伝子に置換されたキュウリモザイクウイルスのRNA2ゲノムに相当する配列、及びアグロバクテリウムのT-DNA配列由来の左境界配列(LB)をこの順序で有する核酸分子。

10

(2) 前記キュウリモザイクウイルスRNA2ゲノムに相当する配列と前記アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の左境界配列(LB配列)との間に、前記植物内で機能するターミネーター配列を有する、(1)の核酸分子。

(3) T-DNAベクターの形態である、(1)又は(2)の核酸分子。

(4) 前記植物が、キュウリモザイクウイルスのRNA1ゲノム及びRNA3ゲノム、ならびにキュウリモザイクウイルスの2bタンパク質をそれぞれ機能的に発現している植物である、(1)~(3)の核酸分子。

20

(5) 植物において外来遺伝子を発現させるための方法であって、植物においてキュウリモザイクウイルスのRNA1ゲノム及びRNA3ゲノム、並びにキュウリモザイクウイルスの2bタンパク質をそれぞれ機能的に発現させる工程、(1)~(3)の核酸分子を前記植物に導入する工程、及び、前記核酸分子が導入された植物を栽培して前記核酸分子に組み込まれた外来遺伝子を発現させる工程を含む方法。

(6) キュウリモザイクウイルスのRNA1ゲノム及びRNA3ゲノムの発現が、アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の右境界配列(RB)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、キュウリモザイクウイルスのRNA1ゲノムに相当する配列、前記植物内で機能するターミネーター配列、及びアグロバクテリウムのT-DNA配列由来の左境界配列(LB)をこの順序で有する核酸分子、並びに、アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の右境界配列(RB)、前記植物内で機能する発現プロモーター配列、キュウリモザイクウイルスのRNA3ゲノムに相当する配列、前記植物内で機能するターミネーター配列、及びアグロバクテリウムのT-DNA配列由来の左境界配列(LB)をこの順序で有する核酸分子を、それぞれ植物に導入することによって行われる、(5)の方法。

30

(7) 核酸分子の植物への導入が、核酸分子を含む溶液の植物への浸透又は注入により行われる、(5)又は(6)の方法。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、植物体の全身の細胞に外来遺伝子を普く移行させて発現させることができるとともに、各細胞での外来遺伝子の発現効率を高め、植物体全体として高発現を達成することができる。また、種々の宿主植物や種々のサイズの外来遺伝子を対象として一過性発現を行うことが可能となる。

40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、CMV-2b遺伝子植物発現ベクター(pGPTV-HPT-2b:核酸分子B)の構成を模式的に示す図である。図中「HPT」はハイグロマイシン耐性遺伝子を、「Tnos」はNosターミネーターを、「Pnos」はNosプロモーターを、「Promoter」はストロベリーベインディングウイルス(SVBV)プロモーター由来内部断片配列+タバコモザイクウイルス(TMV)の5'上流領域(領域)を

50

、「2b」はCMV-2bタンパク質をコードする遺伝子をそれぞれ示す。

【図2】図2は、2b形質転換ニコチアナベンタミアーナタバコの2bタンパク質発現を確認したウエスタンブロットの解析結果を示す写真である。

【図3】図3(a)~(d)は、植物発現用バイナリーベクターの構成を模式的に示す図である。図3(a)は、CMVゲノム1を含むベクター(核酸分子A)、図3(b)は、CMVゲノム2を含むベクター、図3(c)は、CMVゲノム2を含むベクターの2b遺伝子領域を目的遺伝子たる緑色蛍光タンパク質(GFP)に置換したベクター(本発明の核酸分子)、図3(d)は、CMVゲノム3を含むベクター(核酸分子C)を示す。「Pnos」はNosプロモーター、「nptII」はカナマイシン耐性遺伝子、「Tnos」はNosターミネーター、「P35S」はカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来プロモーター配列、「FW-2a-Sal」及び矢印、並びに、「RVCS-pBI」及び矢印は、目的遺伝子たる緑色蛍光タンパク質(GFP)をベクターに挿入する際に使用したPCRプライマーサイトを示す。

【図4】図4(A)、(B)は、接種植物体における葉の蛍光顕微鏡像の写真である。図4(A)は、野生型植物体及び2b形質転換植物体にアグロインフィルトレーション後(接種後5日目)の葉におけるGFP検出時の蛍光顕微鏡写真である。葉の自家蛍光波長をフィルターによりカットした。明部(原写真では緑色)はGFP発現部位を示す。黒色部分はGFPの発光が無い葉の領域を示す。図4(B)は、未接種植物体における葉(ネガティブコントロール)の蛍光顕微鏡写真である。左写真の明部(赤色)は、葉の自家蛍光による。右写真は、左写真と同一画像で葉の自家蛍光波長をフィルターによりカットしたものである。GFPの緑色は検出されない。

【図5】図5(A)、(B)は、CMVゲノムの一部を有する形質転換体への接種後の葉の蛍光顕微鏡像の写真である。図5(A)は、CMVゲノムRNA1形質転換タバコ(CR1-Tg)へのアグロインフィルトレーション後(接種後7日目)の葉におけるGFP検出時の顕微鏡像の写真である。図5(B)は、CMVゲノムRNA3形質転換タバコ(CR3-Tg)へのアグロインフィルトレーション後(接種後5日目)の葉におけるGFP検出時の顕微鏡像の写真である。明部(原写真では緑色)はGFP発現部位、黒色部分はGFPの発光が無い葉の領域を表す。

【図6】2b遺伝子及びCMVゲノムの一部を有する形質転換体への接種後の葉の蛍光顕微鏡像の写真である。左図：2b遺伝子及びCMVゲノムRNA1形質転換タバコ(CR1+2bTg)へのアグロインフィルトレーション後(接種後7日目)の葉におけるGFP検出時の顕微鏡像の写真である。右図：2b遺伝子及びCMVゲノムRNA3形質転換タバコ(CR3+2bTg)へのアグロインフィルトレーション後(接種後5日目)の葉におけるGFP検出時の顕微鏡像の写真である。明部(原写真では緑色)はGFP発現部位、黒色部分はGFPの発光が無い葉の領域を表す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、具体的な実施態様に即して本発明を詳細に説明する。但し、本発明は決して以下の実施態様に束縛されるものではなく、適宜変更を加えて実施することが可能である。

【0016】

[1. 諸言]

まず、本発明の前提となるアグロバクテリウム及びキュウリモザイクウイルスについて説明する。

【0017】

[1-1. アグロバクテリウム]

アグロバクテリウム(Agrobacterium)は、グラム陰性菌に属する土壤細菌であるリゾビウム属(Rhizobium)のうち、植物に対する病原性を有するものの総称である。アグロバクテリウムの例としては、根頭癌腫病に関連するアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)が挙げられる。

【0018】

アグロバクテリウムは、T i プラスミドという巨大プラスミドを有する。T i プラスミドは「T - DNA」(transfer DNA)配列と呼ばれる領域を有し、当該領域に相当するDNA断片が植物細胞に移動し、ランダム導入によって植物ゲノムに組み込まれるという性質を有する。斯かる性質を利用して、T i プラスミドは、植物に形質転換により外来遺伝子を導入して発現させる、等の目的に利用される。

【0019】

T - DNA配列は、ゲノムへの組み込みに必要な右境界配列(right border sequence:以降適宜「RB配列」、或いは単に「RB」と表記する。)と左境界配列(left border sequence:以降適宜「LB配列」、或いは単に「LB」と表記する。)を両端に有し、RB配列とLB配列との間に、植物ホルモン生合成遺伝子及びオパイン生合成遺伝子を有する。

10

【0020】

T i プラスミドは、上記の植物ホルモン生合成遺伝子及びオパイン生合成遺伝子を初め、植物の形質転換には不要な配列を含むため、巨大であり、操作性が悪い。よって現在では、T i プラスミドを改変した2種のプラスミド、即ち、バイナリープラスミドとヘルパープラスミドとを組み合わせたT - DNAバイナリー系によって、植物の形質転換による外来遺伝子の導入を行うことが主流である。

【0021】

バイナリープラスミドは、T - DNA領域から植物の形質転換に不要な領域(例えば上記の植物ホルモン生合成遺伝子やオパイン生合成遺伝子等の領域)を除去した配列と、アグロバクテリウム及び他の微生物(例えば大腸菌等)の双方で機能し得る複製開始点と、選択可能な遺伝子マーカーとを組み込むことにより、アグロバクテリウムと他の微生物との双方で複製可能としたシャトルベクターである。バイナリープラスミドは、T - DNA配列の全体ではなく、通常はT - DNA配列由来のRB配列及びLB配列(並びにその近傍領域)を有し、更に任意選択として、除去された植物ホルモン生合成遺伝子及びオパイン生合成遺伝子等の遺伝子の発現を調節していたnosプロモーター及びnosターミネーターを、RB配列とLB配列との間に有する。植物に導入すべき外来遺伝子は、RB配列とLB配列との間に、且つ、任意選択として前記のnosプロモーター及びnosターミネーターの制御下に配置される。一般に「T - DNAベクター」とは、通常はこのバイナリープラスミドを指す。

20

30

【0022】

ヘルパープラスミドとは、T i プラスミドについて、T - DNA配列のゲノムへのランダム組み込みを生じさせる遺伝子群であるvir領域を残しつつ、T - DNA配列や、その他のT - DNA配列の宿主組換等に不要な領域を除去することにより、小型化した改変プラスミドをいう。T - DNA領域のゲノムへの組み込みを生じさせるvir領域の機能は、トランスに働くことが知られている。よって、上記のT - DNAベクターがvir領域を有していなくとも、vir領域を有するこのヘルパープラスミドをT - DNAベクターと共にアグロバクテリウム内に共存させることで、T - DNAベクター内のT - DNA領域にゲノムへの組み込みを生じさせ、惹いては、RB配列とLB配列との間に配置された外来遺伝子を植物のゲノム内に組み込んで発現させることが可能となる。

40

【0023】

なお、このようなvir領域を有するヘルパープラスミドを使用せず、上述のT - DNAベクターに更にvir領域を組み込んでおき、単独のベクターとして機能させることも可能である。

【0024】

斯かるアグロバクテリウム由来のベクター(上記T - DNAベクター等)を利用して植物に外来遺伝子を一過性発現させる場合、通常はベクターを物理的手法(シリンジ等による注入や減圧等による浸透などの手法)で植物組織内に導入し、植物に感染させる(上記非特許文献1:Grimsley N. et al.参照)。アグロバクテリウム由来のベクターはT - DNA領域の作用により強い感染能を有するため、植物体の全身に物理的手法(注入や浸透

50

等)で普く移行させて感染させれば、植物の全組織でムラなく一様に外来遺伝子を発現させることができる。しかし、上述のように、各細胞における外来遺伝子の発現量は、アグロバクテリウムの調節配列(nosプロモーター及びnosターミネーター等)の能力により制限されてしまうため、植物体全体としての発現レベルを向上させることは困難であった。

【0025】

[1-2. キュウリモザイクウイルス]

キュウリモザイクウイルス(cucumber mosaic virus:以降適宜「CMV」と表記する。)は、プロモウイルス科に属する植物病原性ウイルスであって、3つの1本鎖RNA(RNA1、RNA2、RNA3)からなるゲノムを有する。RNA1、2、3はそれぞれpCY1、pCY2、pCY3としてプラスミド化されている(Suzuki, M., et al., Virology, (1991), 183:106-113)。

10

【0026】

RNA1(pCY1)は、1aタンパク質(レプリカーゼ)をコードする遺伝子を含む。RNA2(pCY2)は、2aタンパク質(RNAポリメラーゼ)をコードする遺伝子と、2bタンパク質をコードする遺伝子とを含む。RNA3(pCY3)は、3aタンパク質(細胞間移行関連タンパク質)をコードする遺伝子と、膜タンパク質をコードする遺伝子とを含む。

【0027】

なお、pCY2の2bタンパク質をコードする遺伝子内に、マルチクローニングサイトを導入することにより、外来遺伝子を組み換え可能としたプラスミドベクター(C2-H1)が開発されている(Matsuo, K., et al., Planta, (2007), 225:277-286)。このプラスミドベクターを用いれば、外来遺伝子を植物細胞内で一過性発現させることが可能である。

20

【0028】

斯かるCMV由来のベクターを用いた手法によれば、CMVの高い自己複製能を利用して外来遺伝子を発現させるため、植物細胞当たりの外来遺伝子の発現量を高めることができる。しかし、植物体の各組織細胞への移行性はウイルスの移行能力に依存するため、植物体全体の細胞にベクターを感染させ、外来遺伝子を発現させることは極めて困難である。その結果、ベクター導入後の植物体は、ウイルスが移行し、外来遺伝子を発現する細胞と、ウイルスが移行せず、外来遺伝子を発現しない細胞とのキメラ(モザイク)状態になってしまう。よって、植物体全体としての発現レベルを向上させることはやはり困難であった。

30

【0029】

[2. 植物において外来遺伝子を発現させるための核酸分子]

本発明の第一の観点によれば、植物において外来遺伝子を発現させるための核酸分子が提供される(なお、この核酸分子を、以降適宜「本発明の核酸分子」と表記する。また、本発明の核酸分子を用いて外来遺伝子を発現させる対象となる植物を、以降適宜「対象植物」と表記する。)

【0030】

本発明の核酸分子は、下記の配列(a)~(e)を、この順序で有する。但し、配列(d)は任意選択である。

40

(a) アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の右境界配列(RB)。

(b) 対象植物内で機能する発現プロモーター配列。

(c) CMVのRNA2ゲノムに相当する配列であって、その2bタンパク質をコードする遺伝子の一部又は全部が、対象植物に発現させる外来遺伝子に置換された配列(以降適宜「外来遺伝子含有CMV RNA2相当配列」と表記する。)

(d) 対象植物内で機能するターミネーター配列。

(e) アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の左境界配列(LB)。

【0031】

50

上記 (a) 及び (e)、即ち、アグロバクテリウムの T - D N A 配列由来の右境界配列 (R B) 及び左境界配列 (L B) は、上述したように、アグロバクテリウムの T - D N A 配列のゲノムへのランダム組み込みに関与する配列である。

【 0 0 3 2 】

上記 (b) 発現プロモーター配列は、対象植物のゲノム内で機能し、外来遺伝子のコーディング配列の転写を開始させることが可能な配列であれば、その種類は制限されない。但し、対象植物内で外来遺伝子を高効率に発現させる観点からは、アグロバクテリウム由来の n o s プロモーターよりも強力な活性を有するプロモーターを用いることが好ましい。斯かるプロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウイルス (C a M V) の 3 5 S R N A プロモーター (Odell et al., (1985), Nature, 313:810-812)、キャッサバモザイクウイルスプロモーター、ゴマノハグサモザイクウイルスプロモーター、バドナウイルス (Badnavirus) プロモーター、ストロベリーベインバインディングウイルス (S V B V) のプロモーター、ミラビリス (Mirabilis) モザイクウイルスプロモーター (M M V)、ルビスコ (Rubisco) プロモーター、アクチンプロモーター、ユビキチンプロモーター等が挙げられる。中でも、カリフラワーモザイクウイルス (C a M V) の 3 5 S R N A 由来のプロモーター等が好ましい。

10

【 0 0 3 3 】

上記 (c) 外来遺伝子含有 C M V R N A 2 相当配列において、C M V の R N A 2 ゲノムに相当する配列としては、通常は R N A 2 ゲノムの c D N A 配列が用いられる。上述のように、C M V の R N A 2 ゲノムには、2 a タンパク質をコードする遺伝子と、2 b タンパク質をコードする遺伝子とが含まれる。本発明では R N A 2 ゲノムの c D N A 配列のうち、2 b タンパク質をコードする遺伝子に相当する配列の一部又は全部を、外来遺伝子と置換する。

20

【 0 0 3 4 】

置換の態様は任意であるが、外来遺伝子の転写効率を向上させる観点からは、外来遺伝子のコーディング配列の開始コドンを、R N A 2 b を発現させるためのサブゲノミックプロモーターの下流から置換することが好ましい。また、外来遺伝子長は、2 b タンパク質をコードする遺伝子における置換される配列の長さとも一致させ、置換前後の配列長が同一となるように置換することが好ましいが、R N A 2 ゲノムの C M V 粒子への組み込みが阻害されない限りにおいて、外来遺伝子長は、置換される配列の長さよりも長短いいずれでもよく、置換前後で長さを一致させる必要はない。

30

【 0 0 3 5 】

また、本配列には、ウイルスでの転写・翻訳効率を向上させる等の目的で、種々の改変を加えてもよい。好ましい改変の例としては、開始コドン (A U G) 周辺への特定配列の導入 (例えば “ A / T X X A U G X C ” : ここで X は任意の塩基を表す。)、リボソーム内部進入部位 (internal ribosomal entry site : I R E S) 配列の導入、リボザイムによる切断可能な配列の導入等が挙げられる。

【 0 0 3 6 】

上記 (d) ターミネーター配列は、上述の通り任意選択要素である。但し、外来遺伝子のコーディング配列の転写を確実に停止させ、所望の機能的なタンパク質を発現させる観点からは、本発明の核酸分子はターミネーター配列を有することが好ましい。ターミネーター配列は、外来遺伝子のコーディング配列の転写を停止させることが可能な配列であれば、その種類は制限されない。例としては、アグロバクテリウム由来の n o s ターミネーターや、ヒートショックプロテイン (h s p) ターミネーター、カリフラワーモザイクウイルス (C a M V) の 3 5 S R N A ターミネーター等が挙げられる。

40

【 0 0 3 7 】

また、上記 (b) 発現プロモーター配列及び (c) 外来遺伝子含有 C M V R N A 2 相当配列 (並びに任意配列である (d) ターミネーター配列) は、(c) に含まれる機能的な遺伝子 (即ち、2 a タンパク質をコードする遺伝子及び外来遺伝子) を発現させることが可能となるように、作動式に連結される。即ち、上記の (b) 及び (c) (並びに任意

50

により (d)) は、植物ゲノム内で自律的に発現可能な発現カセットを構成する (なお、この発現カセットを以降適宜「本発明の発現カセット」と表記する。)。言い換えれば、この本発明の発現カセットは、(a) 右境界配列 (RB) 及び (e) 左境界配列 (LB) のランダム組み込みによって植物ゲノム内に導入され、2 a タンパク質及び外来遺伝子を自律的に発現することになる。

【0038】

本発明の核酸分子は、その機能を実質的に妨げない限りにおいて、更に他の配列を有していてもよい。他の配列の例としては、アグロバクテリウムの Ti プラスミド由来の他の任意の配列 (例えば vir 領域等) や、選択マーカー遺伝子等が挙げられる。選択マーカー遺伝子は、本発明の核酸分子の導入を確認する目的で用いられる。その種類は制限されないが、通常は各種の抗生物質耐性遺伝子や薬剤耐性遺伝子、例えばアンピシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ヒグロマイシン、アクチノニン (PDF1 遺伝子)、ピアラホス除草剤、グリホサート除草剤、スルホンアミド、マンノース等に対する耐性をもたらず遺伝子等が挙げられる。また、選択マーカー遺伝子は、通常は固有のプロモーター等の調節配列と作動式に連結され、植物ゲノム内で自律的に発現する発現カセットとして構成される (これを以降適宜「選択マーカー発現カセット」と表記する。)) とともに、上記の (a) 右境界配列 (RB) と (e) 左境界配列 (LB) との間 (本発明の発現カセットの 3' 側又は 5' 側) に配置される。これにより、右境界配列 (RB) 及び左境界配列 (LB) のゲノムへのランダム組み込みによって、選択マーカー発現カセットが (本発明の発現カセットと共に) 植物ゲノム内に導入され、自律的に発現することになる。

【0039】

本発明の核酸分子は、直鎖状の形態であっても環状の形態であってもよい。但し、環状の形態、例えばプラスミドの形態であることが好ましく、特に、アグロバクテリウム内で複製能を有する T-DNA ベクターの形態であることが好ましい。

【0040】

上述した構成を有する本発明の核酸分子は、当業者に周知の各種の遺伝子組み換え技術を適宜組み合わせることで用いることにより、容易に作製することが可能である。

【0041】

本発明の核酸分子は、対象植物において外来遺伝子を発現させるために用いることができる。斯かる方法については次章で詳細に説明する。

【0042】

[3 . 植物において外来遺伝子を発現させるための方法]

本発明の第二の観点によれば、上述の本発明の核酸分子を用いて、植物において外来遺伝子を発現させるための方法が提供される (なお、この方法を、以降適宜「本発明の方法」と表記する。))。

【0043】

本発明の方法は、少なくとも下記の工程 (i) ~ (iii) を含む。

(i) 対象植物において、CMV の RNA 1 ゲノム及び RNA 3 ゲノム並びに CMV の 2 b タンパク質をそれぞれ機能的に発現させる工程。

(ii) 本発明の核酸分子を対象植物に導入する工程。

(iii) 本発明の核酸分子が導入された対象植物を栽培して、本発明の核酸分子に組み込まれた外来遺伝子を発現させる工程。

【0044】

本発明の方法に使用される対象植物には特に制限はなく、任意の種の植物を用いることが可能である。また、植物体のみならず、その一部の組織や細胞等の培養物を用いることもできる。

【0045】

本発明を適用可能な植物の例としては、アルファルファ、オオムギ、インゲンマメ、カノーラ、ササゲ、綿、トウモロコシ、クローバー、ハス、レンズマメ、ルピナス、キビ、

10

20

30

40

50

オートムギ、エンドウマメ、落花生、イネ、ライムギ、スイートクローバー、ヒマワリ、スイートピー、ダイズ、モロコシ、ライコムギ、クズイモ、ハッシュョウマメ、ソラマメ、コムギ、フジ、堅果植物等が挙げられる。

好ましい植物としては、イネ科、キク科、ナス科、バラ科の植物が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

更に好ましい植物としては、以下の属に由来する植物が挙げられる。シロイヌナズナ、コヌカグサ、ネギ、キンギョソウ、オランダミツバ、ナンキンマメ、アスパラガス、ロウトウ、カラスムギ、ホウライチク、アブラナ、ブロムグラス、ルリマカリバナ、ツバキ、アサ、トウガラシ、ヒヨコマメ、ケノボジ、キクニガナ、カンキツ、コーヒーノキ、ジュズダマ、キュウリ、カボチャ、ギョウギシバ、カモガヤ、チョウセンアサガオ、ウリミバエ、ジギタリス、ヤマノイモ、アブラヤシ、オオシバ、フェスキュ、イチゴ、フクロウソウ、ダイズ、ヒマワリ、キスゲ、パラゴムノキ、オオムギ、ヒヨス、サツマイモ、レタス、ヒラマメ、ユリ、アマ、ライグラス、ハス、トマト、マヨラナ、リンゴ、マンゴー、イモノキ、ウマゴヤシ、アフリカウンラン、タバコ、イガマメ、イネ、キビ、テンジクアオイ、チカラシバ、ツクバネアサガオ、エンドウ、インゲン、アワガエリ、イチゴツナギ、サクラ、キンポウゲ、ラディッシュ、スグリ、トウゴマ、キイチゴ、サトウキビ、サルメンバナ、ライムギ、セネシオ、セタリア、シロガラシ、ナス、ソルガム、イヌシバ、カカオ、ジャジクソウ、レイリョウコウ、コムギ、ソラマメ、ササゲ、ブドウ、トウモロコシ等。

10

【 0 0 4 7 】

本発明の方法に使用される外来遺伝子にも特に制限はなく、任意の遺伝子を用いることが可能である。例としては、各種の天然又は合成の遺伝子、並びにその断片、変異体、改変体等が挙げられる。

20

【 0 0 4 8 】

外来遺伝子の具体例としては、各種のサイトカイン、免疫原性物質、抗体、酵素、血液由来成分、アジュバント作用物質、ウイルス由来成分、病原微生物由来成分等が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

工程 (i) では、対象植物において、CMVのRNA 1ゲノム及びRNA 3ゲノム、並びにCMVの2 bタンパク質を、それぞれ機能的に発現させる。

30

【 0 0 5 0 】

本工程は、例えば、CMVのRNA 1ゲノムに相当する配列、CMVのRNA 2ゲノムの2 bタンパク質をコードする遺伝子に相当する配列、及び、CMVのRNA 3ゲノムに相当する配列を対象植物に導入し、植物ゲノム内に組み込んで機能的に発現させることにより達成される。これらの配列を対象植物に導入する時機や順序についても制限はない。即ち、これらの配列を同時に導入してもよく、任意の順序で別個に導入してもよい。

なお、工程 (i) では、これらの配列の一部又は全部を既に有する組み換え植物等の既存の植物を用い、必要に応じて更に残る配列を導入した上で、その後の工程 (ii) に使用してもよい。また、工程 (i) におけるこれらの配列の一部又は全部の対象植物への導入を、工程 (ii) の本発明の核酸分子の対象植物への導入と同時に進めてもよい。

40

【 0 0 5 1 】

工程 (i) において、CMVのRNA 1ゲノムに相当する配列、CMVのRNA 2ゲノムの2 bタンパク質をコードする遺伝子に相当する配列、及び、CMVのRNA 3ゲノムに相当する配列を対象植物に導入する手法としては、通常、植物発現ベクターを用いた形質転換による導入法が用いられる。

【 0 0 5 2 】

植物発現ベクターとしては任意のものを用いることが可能である。例としては、各種のウイルスベクター、ファージベクター、プラスミドベクター等が挙げられる。ウイルスベクターの好ましい具体例としては、タバコモザイクウイルス (TMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) ポテトエックスウイ

50

ルス (P V X)、クローバーイエローベインウイルス (C L Y V V) 等の各種の一本鎖 RNA ウイルス由来のベクター等が挙げられる。中でもキュウリモザイクウイルス (C M V) 由来のベクターが挙げられる。これらの植物発現ベクターを用いて対象植物細胞を形質転換する手法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、プロトプラスト P E G 介在形質転換法、パーティクル・ガン法等が挙げられる。植物発現ベクターや形質転換の詳細な条件については、対象植物や導入配列等に応じて公知の条件の中から適宜選択すればよい。

【 0 0 5 3 】

また、C M V の R N A 1、C M V の R N A 2 ゲノムの 2 b タンパク質、及び R N A 3 ゲノムについて、上述の本発明の核酸分子と同様の構成を有する以下の核酸分子 A、B 及び C をそれぞれ使い、これらを対象植物に導入して発現させることも可能である。

10

【 0 0 5 4 】

核酸分子 A は、下記の配列 (a)、(b)、(c ')、(d) 及び (e) を、この順序で有する。但し、配列 (d) は任意選択である。

(a) アグロバクテリウムの T - D N A 配列由来の右境界配列 (R B)。

(b) 対象植物内で機能する発現プロモーター配列。

(c ') C M V の R N A 1 ゲノムに相当する配列。

(d) 対象植物内で機能するターミネーター配列。

(e) アグロバクテリウムの T - D N A 配列由来の左境界配列 (L B)。

【 0 0 5 5 】

20

配列 (a)、(b)、(d) 及び (e) については、本発明の核酸分子について説明したとおりである。

【 0 0 5 6 】

配列 (c ')、即ち、C M V の R N A 1 ゲノムに相当する配列としては、通常は C M V の R N A 1 ゲノムの c D N A 配列が用いられる。本配列には、ウイルスでの転写・翻訳効率を向上させる等の目的で、種々の改変を加えてもよい。好ましい改変の例としては、本発明の核酸分子の配列 (c) について上述した各種の改変が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

核酸分子 A においても、上記 (b) 発現プロモーター配列及び (c ') C M V の R N A 1 ゲノムに相当する配列 (並びに任意配列である (d) ターミネーター配列) は、(c ') の R N A 1 ゲノムを発現させることが可能となるように作動式に連結され、植物ゲノム内で自律的に発現可能な発現カセットを構成する (なお、この発現カセットを以降適宜「発現カセット A」と表記する。)。この発現カセット A は、(a) 右境界配列 (R B) 及び (e) 左境界配列 (L B) のランダム組み込みによって植物ゲノム内に導入され、R N A 1 ゲノムを自律的に発現することになる。

30

【 0 0 5 8 】

核酸分子 B は、下記の配列 (a)、(b)、(c ")、(d) 及び (e) を、この順序で有する。但し、配列 (d) は任意選択である。

(a) アグロバクテリウムの T - D N A 配列由来の右境界配列 (R B)。

(b) 対象植物内で機能する発現プロモーター配列。

(c ") C M V の R N A 2 ゲノムの 2 b 領域 (2 b タンパク質をコードする遺伝子) に相当する配列。

40

(d) 対象植物内で機能するターミネーター配列。

(e) アグロバクテリウムの T - D N A 配列由来の左境界配列 (L B)。

【 0 0 5 9 】

配列 (a)、(b)、(d) 及び (e) については、本発明の核酸分子について説明したとおりである。

【 0 0 6 0 】

配列 (c ")、即ち、C M V の R N A 2 ゲノムの 2 b 領域 (2 b タンパク質をコードする遺伝子) に相当する配列としては、通常は C M V の R N A 2 b の c D N A 配列が用いら

50

れる。本配列にも、ウイルスでの転写・翻訳効率を向上させる等の目的で、種々の改変を加えてもよい。好ましい改変の例としては、本発明の核酸分子の配列(c)について上述した各種の改変が挙げられる。

【0061】

核酸分子Bにおいても、上記(b)発現プロモーター配列及び(c'')CMVのRNA3ゲノムに相当する配列(並びに任意配列である(d)ターミネーター配列)は、(c'')のRNA2ゲノムの2b領域を発現させることが可能となるように、作動式に連結され、植物ゲノム内で自律的に発現可能な発現カセットを構成する(なお、この発現カセットを以降適宜「発現カセットB」と表記する。)。この発現カセットBは、(a)右境界配列(RB)及び(e)左境界配列(LB)のランダム組み込みによって植物ゲノム内に導入され、RNA3ゲノムを自律的に発現することになる。

10

【0062】

核酸分子Cは、下記の配列(a)、(b)、(c''')、(d)及び(e)を、この順序で有する。但し、配列(d)は任意選択である。

(a) アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の右境界配列(RB)。

(b) 対象植物内で機能する発現プロモーター配列。

(c''') CMVのRNA3ゲノムに相当する配列。

(d) 対象植物内で機能するターミネーター配列。

(e) アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の左境界配列(LB)。

【0063】

配列(a)、(b)、(d)及び(e)については、本発明の核酸分子について説明したとおりである。

20

【0064】

配列(c''')、即ち、CMVのRNA3ゲノムに相当する配列としては、通常はCMVのRNA3ゲノムのcDNA配列が用いられる。本配列にも、ウイルスでの転写・翻訳効率を向上させる等の目的で、種々の改変を加えてもよい。好ましい改変の例としては、本発明の核酸分子の配列(c)について上述した各種の改変が挙げられる。

【0065】

核酸分子Cにおいても、上記(b)発現プロモーター配列及び(c''')CMVのRNA3ゲノムに相当する配列(並びに任意配列である(d)ターミネーター配列)は、(c''')のRNA3ゲノムを発現させることが可能となるように、作動式に連結され、植物ゲノム内で自律的に発現可能な発現カセットを構成する(なお、この発現カセットを以降適宜「発現カセットC」と表記する。)。この発現カセットCは、(a)右境界配列(RB)及び(e)左境界配列(LB)のランダム組み込みによって植物ゲノム内に導入され、RNA3ゲノムを自律的に発現することになる。

30

【0066】

核酸分子A、B及びCは、その機能を実質的に妨げない限りにおいて、更に他の配列を有していてもよい。他の配列の例としては、アグロバクテリウムのTiプラスミド由来の他の任意の配列(例えばvir領域等)や、選択マーカー遺伝子等が挙げられる。選択マーカー遺伝子については上述した通りである。

40

【0067】

核酸分子A、B及びCは、直鎖状の形態であっても環状の形態であってもよい。但し、環状の形態、例えばプラスミドの形態であることが好ましく、特に、アグロバクテリウム内で複製能を有するT-DNAベクターの形態であることが好ましい。

【0068】

核酸分子A及びBは、アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の右境界配列(RB)及び左境界配列(LB)の作用により、植物細胞に対して強い感染能を有する。即ち、高い効率で植物細胞のゲノムへのランダム組み込みを生じ、右境界配列(RB)と左境界配列(LB)との間に介在する配列(即ちRNA1ゲノム又はRNA3ゲノム等)が植物ゲノム内に導入され、植物内で発現することになる。よって、植物体の全身に物理的手法(

50

注入や浸透等)で普く移行させて感染させれば、植物の全組織の細胞内でムラなく一様に外来遺伝子を発現させることができる。

【0069】

核酸分子A及び/又はB及び/又はCを用いて、CMVのRNA1及び/又はRNA2ゲノムの2b領域及び/又はRNA3ゲノムを対象植物に導入する場合、その導入の手法は限定されないが、これらの核酸分子を含む溶液を調製し、当該溶液を各種の物理的手法、例えば注入や浸透等の手法で、植物組織内に導入することが好ましい。斯かる手法の詳細な条件としては、後述する工程(ii)において、本発明の核酸分子を対象植物に導入する手法と同様の条件を使用することが可能である。

【0070】

なお、上述した核酸分子A、B及びCや、その他の各種のベクターは、当業者に周知の各種の遺伝子組み換え技術を適宜組み合わせて用いることにより、容易に作製することが可能である。

【0071】

工程(ii)では、本発明の核酸分子を対象植物に導入する。

導入の手法は限定されないが、例えば、本発明の核酸分子を含む溶液を調製し、当該溶液を各種の物理的手法、例えば注入や浸透等の手法で、植物組織内に導入することが好ましい。

【0072】

本発明の核酸分子を含む溶液の調製は、例えば、本発明の核酸分子を産生するアグロバクテリウム等の微生物を培養し、得られた培養物(例えば一晚培養物等)を用いることができる。通常、一晚培養は波長600nmの光学密度(OD_{600})が3~3.5単位に達する。これを、アグロ浸潤の前に3~5回希釈され、一般に $5 \sim 9 \times 10^9$ コロニー形成単位を生ずる(Turpen et al., (1993), J. Virol. Methods, 42:227-240)。このような培養物を、例えば、MESバッファー等のバッファーを用いて、 10^2 倍、好ましくは 10^3 倍、より好ましくは 10^4 倍に希釈し、 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.8$ になるように懸濁する。これらの菌体溶液を各々単独で使用する場合は、 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.6$ 値の懸濁液に調製する。複数の菌体溶液を混合して使用する場合には、各々の菌体を等量ずつ混合して、最終の懸濁液の菌体量を $OD_{600} = 0.3 \sim 1.2$ 値に調製する。

【0073】

本発明の核酸分子を含む溶液を注入により対象植物に導入する場合、例えばシリンジ等を用いて、当該溶液を対象植物に強制的に注射することにより行う。本発明の核酸分子を含む溶液を浸透により対象植物に導入する場合は、本発明の核酸分子を含む溶液を対象植物と接触させた上で、例えば真空デシケーター等を用いて減圧条件とし、当該溶液を対象植物に強制的に浸透させることにより行う。

以上の手法を用いて、本発明の核酸分子を、対象植物の全組織に一様に行き渡らせることが好ましい。

【0074】

なお、本発明の核酸分子によって、T-DNA配列由来の右境界配列(RB)及び左境界配列(LB)と、植物ゲノムへのランダム組み込みを生じさせるには、上述のようにTiプラスミド由来のvir領域が必要となる。よって、本発明の核酸分子が当該vir領域を有しない場合には、本発明の核酸分子と共に、当該vir領域を有するヘルパープラスミドを導入する。一方、本発明の核酸分子が当該vir領域を有する場合は、ヘルパープラスミドは不要である。

【0075】

また、工程(i)におけるCMVのRNA1及び/又はRNA3ゲノムを対象植物への導入を、上述の核酸分子A及び/又はBを用いて行う場合、工程(ii)における本発明の核酸分子の対象植物への導入と同時に進めてもよい。この場合、本発明の核酸分子と、核酸分子A及び/又はBとを含む溶液を調製し、当該溶液を単一の注入や浸透等の操作により、同時に植物組織内に導入することが好ましい。ここで、本発明の核酸分子と、核酸分

10

20

30

40

50

子A及び/又はBとからなる核酸分子のセット、例えばTiベクターセットも、本発明の対象となる。

【0076】

工程(iii)では、本発明の核酸分子が導入された対象植物を栽培して、本発明の核酸分子に組み込まれた外来遺伝子を発現させる。対象植物を栽培する手法は、対象植物の種類や外来遺伝子を発現させる目的等に応じて、適宜選択すればよい。

【0077】

[4.小括]

以上説明した本発明の核酸分子は、アグロバクテリウムのT-DNA配列由来の右境界配列(RB)及び左境界配列(LB)の作用により、植物細胞に対して強い感染能を有する。即ち、高い効率で植物細胞のゲノムへのランダム組み込みを生じ、右境界配列(RB)と左境界配列(LB)との間に介在する配列(即ち上記の本発明の発現カセット等)が、植物ゲノム内に導入され、植物内で発現することになる。よって、本発明によれば、植物体の全身に物理的手法(注入や浸透等)で普く移行させて感染させれば、植物の全組織の細胞内でムラなく一様に外来遺伝子を発現させることができる。

【0078】

また、本発明の核酸分子は、CMVのRNA2ゲノムの2bタンパク質をコードする遺伝子内に外来遺伝子を有し、且つ、独自の発現プロモーター配列の制御下で外来遺伝子をCMVの2aタンパク質と共に自律的に発現するように構成されている。よって、本発明の核酸分子を、CMVのRNA1ゲノム及びRNA3ゲノム並びにCMVの2bタンパク質をそれぞれ機能的に発現している植物に感染させることで、CMVのゲノム発現産物をトランスに補償し、CMVの高い自己複製能を利用して外来遺伝子を発現させることができる。惹いては、植物細胞当たりの外来遺伝子の発現量も高めることができ、更には対象となる宿主植物の種類についても、自由度を高めることができる。

【0079】

更に、本発明の核酸分子は、従来のmagnICON(登録商標)システムのベクターと比べて、外来遺伝子以外の配列を最小限に抑えることができるため、従来よりも大型の外来遺伝子を導入できるという利点がある。

【実施例】

【0080】

以下、実施例を示し、本発明を更に詳細に説明する。但し、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、適宜変更を加えて実施することが可能である。

【0081】

なお、以下の記載において、GFP蛍光の検出は、GFP落射蛍光装置SZX-RFL2(SZX fluorescence illumination system: オリンパス株式会社)を使用して蛍光顕微鏡写真を取得することにより行った。

【0082】

[実験1]

CMV2bタンパク質の植物発現ベクターの構築

ハイグロマイシン耐性遺伝子発現カセットを有する植物発現用バイナリーベクター(pGPTV-HPT)に挿入済みのウイルス由来プロモーター内部配列の下流に、CMV2b遺伝子を挿入した。2b遺伝子の両末端に設計したCMV-2b-F1(配列番号1: 5'-ATGGAATTGAACGTAGGTGCAATG-3')及びCMV-2b-R1(配列番号2: 5'-TCAGAAAGCACCTTCCGCC-3')プライマーを用いてCMVのRNA2ゲノムを鋳型にPCRを行い、333bp長の増幅産物を得た。TACクローニングを行って制限酵素配列を付与したXbaI-2b遺伝子-SacI断片を得た。植物発現用ベクターpGPTV-HPTベクターを制限酵素XbaI及びSacIで切断して線状化し、XbaI-2b遺伝子-SacI断片をライゲーションして、pGPTV-HPT-2b(核酸分子B)を構築した。このcDNAクローンの配列に対して、制限酵素部位の確認及びABI PRISM Big Dye Terminator (Applied Biosystems, US

10

20

30

40

50

A) を用いたシーケンシングを行い、ミスが無いことを確認した。CMV 2 b 遺伝子の植物発現ベクターの構造を図 1 に模式的に示す。

【 0 0 8 3 】

[実験 2]

植物発現用ベクターのアグロバクテリウムへの形質転換方法

アグロバクテリウム (L B A 4 4 0 4) への植物バイナリーベクターの形質転換には、液体窒素による凍結融解 (Freeze thaw) 法 (Holsters M. et. al, (1978), Mol. Gen. Genet., 163(2):181-7) を使用した。得られた形質転換アグロバクテリウム菌体 (L B A 4 4 0 4) を、1 0 0 m g / l リファンピシン、3 0 0 m g / l ストレプトマイシン、5 0 m g / l カナマイシンを添加した L B 培地中で、2 8 ℃ で一晩振盪培養することにより、菌体液を得た。

10

【 0 0 8 4 】

[実験 3]

2 b 形質転換植物体の作出

タバコ (*Nicotiana benthamiana*) への形質転換は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) を使い、リーフディスク法 (Horsch RB. et al., (1984), Science, 223:496-498) により実施した。タバコの葉から直径約 1 c m のリーフディスクを切り出し、p G P T V - H P T - 2 b を保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) L B A 4 4 0 4 株の菌液に浸して、2 日間 M S (Murashige-Skoog) 寒天培地上で共存培養を行った。共存培養したリーフディスクは、3 日後に付着アグロバクテリウムを洗浄し、1 5 m g / l ハイグロマイシン及び 5 0 0 m g / l カルベニシリンを添加した再分化用 M S 培地上で培養 (2 3 ℃ 、1 6 時間明期、8 時間暗期) し、二週間毎に継代を行った。再分化して得られたシュートは、1 5 m g / l ハイグロマイシン及び 5 0 0 m g / l カルベニシリンを添加した発根用 M S 培地で発根を誘導した後、培養個体を組換え温室内で馴化して土耕栽培による育成を行い、次世代種子 (T 1 個体) を得た。

20

【 0 0 8 5 】

[実験 4]

2 b 形質転換体の 2 b タンパク質発現解析

再分化した培養個体 (T 0 個体) から、葉を採取して液体窒素を用いて粉碎した後、S D S - P A G E 泳動用バッファーを加えて磨砕した。磨砕液は遠心分離 (4 ℃ 、1 2 0 0 0 r p m、1 0 分) を行い、上清を S D S - P A G E に供した。トランスファーには、P V D F 膜を用い、抗 2 b 抗体によるウエスタンブロット解析を実施した。再分化した個体の中から 2 b タンパク質を発現している形質転換タバコを選抜し、後述の [実験 6] の接種試験に使用した。ウエスタンブロットの解析結果を示す写真を図 2 に示す。

30

【 0 0 8 6 】

[実験 5]

CMV の分節ゲノムを挿入した目的遺伝子発現用バイナリーベクターの構築

鈴木匡の博士論文 (「キュウリモザイクウイルス遺伝子の機能に関する研究」、1 9 9 7 年、東京大学博士論文、国会図書館、書誌 I D : 0 0 0 0 0 3 4 3 7 0 7) に記載された方法に従い、CMV の分節ゲノムの全長 c D N A を植物発現用バイナリーベクター p B I 1 2 1 に挿入したプラスミド p B I - C R 1 , 2 , 3 を構築した。具体的には、CMV の有する分節ゲノム : R N A 1、R N A 2、R N A 3 (ウイルスゲノム) を各々鋳型として c D N A を増幅し、I n - f u s i o n キット (タカラバイオ株式会社) を用いて C M V 3 5 S プロモーター (P 3 5 S) とノパリンシンターゼのターミネーター (T n o s) と間に各々組み込み、p B I 1 2 1 に挿入して、p B I - C R 1 , 2 , 3 を得た。さらに、目的遺伝子の挿入可能なベクターを構築するため、マーカー遺伝子としても利用されるオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein : G F P) 遺伝子を、p B I - C R 2 の 2 b 遺伝子領域と置換した p B I - C R 2 2 b - G F P の作出を行った。まず CMV ベクターの一部である p U C 1 1 8 をバックボーンとする p C Y 2

40

50

- H1の制限酵素サイトStuI及びSpeI間にGFP遺伝子を挿入したpCY2-H1-GFPを鋳型として、このベクターの2a遺伝子内の制限酵素サイトSalIからRNA2ウイルスゲノム3'末端のSacIまでの領域を増幅するプライマーFW2a-SalI(配列番号3:5'-TAGTTACGGTGTCTGACACTCCC-3')及びRVCS-pBI(配列番号4:5'-GATCGGGGAAATTCGAGCTCACCGCGGTGGCGG-3')を用いたPCRにより増幅した。これにより約3290bpのcDNAを得た。一方、先に構築したベクターpBI-CR2を制限酵素SalI及びSacIで消化して線状化した。In-fusionキット(Takara)を用いて線状化したベクターとPCRで増幅した約3290bpのインサートとのライゲーションを行った後、コンピテントセル(HB101)に形質転換してpBI-CR2 2b-GFPのクローンを得た。このcDNAクローンの配列は、制限酵素サイトの確認と、シーケンシングによりミスが無いことを確認した。以上の手順により、CMVゲノム1を含むベクター(核酸分子A)、CMVゲノム2を含むと共に2b遺伝子領域を目的遺伝子たるGFPに置換したベクター(本発明の核酸分子)、及び、CMVゲノム3を含むベクター(核酸分子C)を作製した。本発明では、CMVの3本の分節ゲノムを基として利用しているため、植物体内でRNA1、RNA2(目的遺伝子挿入済み)、RNA3という3本のウイルスゲノムを同時かつ同一空間に発現させる必要がある。このため、これら3分子種のベクターを1セットとして利用する。これらの植物発現用バイナリーベクターの構成を図3(a)~(d)に模式的に示す。図3(a)は、CMVゲノム1を含むベクター(核酸分子A)、図3(b)は、CMVゲノム2を含むベクター、図3(c)は、CMVゲノム2を含むベクターの2b遺伝子領域を目的遺伝子たるGFPに置換したベクター(本発明の核酸分子)、図3(d)は、CMVゲノム3を含むベクター(核酸分子C)を示す。

【0087】

[実験6]

アグロインフィルトレーション法

アグロインフィルトレーション法は、Grimsley N. et. al, (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3282-3286を改変して使用した。CMVの分節ゲノム及びGFP遺伝子を挿入したバイナリーベクターpBI-CR1、pBI-CR2 2b-GFP及びpBI-CR3をそれぞれ保有するアグロバクテリウムを、[実験2]の方法で形質転換を行い、組換えアグロバクテリウム菌体液を得た。それぞれ遠心分離(20、4800rpm、15分)を行い、得られた菌体ペレットをMESバッファー(最終濃度10mM MES、10mM MgCl₂、150μM アセトシリンゴン、pH5.7)にOD₆₀₀=0.2~0.8になるように懸濁した。これらの菌体溶液を各々単独で使用する場合には、OD₆₀₀=0.2~0.6値の懸濁液に調製し、複数の菌体溶液を混合して使用する場合には、各々の菌体を等量ずつ混合して、最終の懸濁液の菌体量をOD₆₀₀=0.3~1.2値に調製した。菌体溶液のニコチアナ・ベンサムアナ(Nicotiana benthamiana)への接種には、針なしシリンジ又は真空デシケーターを用いて強制注入を行った。この操作には、[実験1]及び[実験2]の方法で得た、2b遺伝子を保有するアグロバクテリウム菌体も混合して使用した。これらの接種ベクターの組み合わせを表1に示す。

【0088】

10

20

30

40

【表 1】

表 1 接種植物体及び接種アグロバクテリウム菌体（保有ベクター）の組み合わせ
 (○は等量混合、－は未混合菌体)

導入遺伝子 (プラスミド名)	アグロインフィルトレーションに用いる混合菌体セット			
	2b遺伝子 (pGPTV-HPT-2b) (核酸分子B、 図1)	CMV-RNA1 (pBI-CR1) (核酸分子A、 図3(A))	CMV-RNA2+目的遺伝子 (pBI-CR2Δ2b-GFP) (本発明の核酸分子、 図3(C))	CMV-RNA3 (pBI-CR3) (核酸分子C、 図3(D))
接種植物体名				
野生型植物体	－	○	○	○
野生型植物体	○	○	○	○
2b形質転換植物体	－	○	○	○

10

【0089】

[実験7]

菌体接種植物体の育成及び目的タンパク質の検出

アグロインフィルトレーション法により、形質転換アグロバクテリウムを接種したニコチアナ・ベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*) 又は組換植物体（形質転換植物体）を、人工気象器もしくは照明付植物育成用インキュベーター中で23、16時間明期、8時間暗期で栽培した。接種後の植物体で、目的遺伝子（GFP）が発現していることを確かめるため、GFPを可視化可能な波長域の青色光を照射し、3～14日栽培した植物体でGFPの蛍光を確認した。[実験6]の方法で、表1に記載した接種植物体及び接種アグロバクテリウム菌体（保有ベクター）の組み合わせで、アグロインフィルトレーションを実施した結果、2bタンパク質もしくは2b遺伝子が植物体に存在しない場合には、GFPは殆どが葉脈に局在する。一方、植物体から2bタンパク質を供給した場合、又は、2b遺伝子を有するアグロバクテリウム菌体からアグロインフィルトレーションにより2bタンパク質を一過的に供給した場合には、何れにおいても2bタンパク質の存在下で、GFPが葉全体（葉脈＋葉肉組織）で発現していることが確認できた。

20

30

【0090】

接種植物体における葉のGFP検出結果を表す蛍光顕微鏡写真を図4(A)、(B)に示す。図4(A)は、野生型植物体及び2b形質転換植物体にアグロインフィルトレーション後（接種後5日目）の葉の蛍光顕微鏡写真である。図4(B)は、未接種植物体における葉（ネガティブコントロール）の蛍光顕微鏡写真である。図4(A)、(B)では、GFP落射蛍光装置SZX-RFL2（SZX fluorescence illumination system：オリンパス株式会社）を使用してGFP蛍光写真を取得した。図4(A)、(B)は、接種植物体における葉の蛍光顕微鏡像の写真である。

【0091】

[実験8]

CMVの分節ゲノムRNA1又はRNA3を有する形質転換植物体の作出

CMVのタンパク質の一部又は(2aを除く)全部を植物体に発現させるため、まずCMVの分節ゲノムRNA1又はRNA3を有する形質転換植物体の作出を行った。[実験5]で構築したpBI-CR1又はpBI-CR3を、それぞれ保有するアグロバクテリウムLBA4404株を[実験2]の方法で形質転換を行って組換アグロバクテリウム菌体液を得た。その後、抗生物質をハイグロマイシンからカナマイシンに変更した他は[実験3]と同様の手順で、リーフディスク法(Horsch RB. et al., Science, (1984), 223: 496-498)によるニコチアナ・ベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*) への形質転換を実施した。タバコの葉から直径約1cmのリーフディスクを切り出し、pBI-CR1又はpBI-CR3を保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)

40

50

facients) L B A 4 4 0 4 株の菌液に浸して、M S (Murashige-Skoog) 寒天培地上で 2 日間共存培養を行った。共存培養したリーフディスクは、3 日後に付着アグロバクテリウムを洗浄し、5 0 m g / l カナマイシン及び 5 0 0 m g / l カルベニシリンを添加した再分化用 M S 培地上で培養 (2 3 、 1 6 時間明期、8 時間暗期) し、二週間毎に継代を行った。再分化して得られたシュートは、5 0 m g / l カナマイシン及び 5 0 0 m g / l カルベニシリンを添加した発根用 M S 培地で発根を誘導した後、培養個体を組換え温室内で馴化して土耕栽培による育成を行い、次世代種子 (T 1 個体) を得た。

【 0 0 9 2 】

[実験 9]

CMV ゲノム RNA 1 又は RNA 3 形質転換体の接種用植物体としての機能解析

CMV ゲノム RNA 1 又は RNA 3 形質転換体の次世代種子 (T 1 個体) を、1 2 5 m g / l カナマイシンを添加した培地に無菌播種し、カナマイシン耐性が付与された T 1 個体を選抜した。この芽生えを土耕栽培して温室内で育成を行った。播種後、約 2 ヶ月栽培した植物体に、[実験 6] の方法で、アグロインフィルトレーションを実施した。CMV ゲノム RNA 1 形質転換体の T 1 個体には、p B I - C R 2 2 b - G F P と p B I - C R 3 を有する 2 種類のアグロバクテリウム菌体溶液を 1 : 1 に等量混合して最終の懸濁液の菌体量を $OD_{600} = 0.6$ 値に調製した。また、CMV ゲノム RNA 3 形質転換体の T 1 個体には、p B I - C R 1 と p B I - C R 2 2 b - G F P を有する 2 種類のアグロバクテリウム菌体溶液を 1 : 1 に等量混合した懸濁液の菌体量を最終濃度 $OD_{600} = 0.6$ 値に調製した。いずれも、組換え植物体への接種には、針なしシリンジ又は真空デシケータを用いて強制注入を行った。さらに本発明において必須である、2 b 遺伝子をこれらの形質転換植物体に供給するため、アグロインフィルトレーション法による一過性発現を実施した。CMV ゲノム RNA 1 形質転換体 (C R 1 - T g) の T 1 個体には、p B I - C R 2 2 b - G F P と p B - C R 3 及び p G P T V - H P T - 2 b を有する 3 種類のアグロバクテリウム菌体溶液を 1 : 1 : 1 に等量混合して最終の懸濁液の菌体量を $OD_{600} = 0.9$ 値に調製した。また、CMV ゲノム RNA 3 形質転換体 (C R - 3 T g) の T 1 個体には、p B I - C R 1 と p B I - C R 2 2 b - G F P 及び p G P T V - H P T - 2 b を有する 3 種類のアグロバクテリウム菌体溶液を 1 : 1 : 1 に等量混合して最終の懸濁液の菌体量を $OD_{600} = 0.9$ 値に調製し、植物体への強制注入を行った。アグロインフィルトレーションによる接種後、[実験 7] の方法で、5 ~ 7 日間栽培を行った。

【 0 0 9 3 】

続いて、以下の表 2 に記載した接種植物体及び接種アグロバクテリウム菌体 (保有ベクター) の組み合わせで、アグロインフィルトレーションを実施した。

【 表 2 】

表 2 接種植物体及び接種アグロバクテリウム菌体 (保有ベクター) の組み合わせ

(○は等量混合、-は未混合菌体)

導入遺伝子 (プラスミド名)	アグロインフィルトレーションに用いる混合菌体セット			
	2b 遺伝子 (pGPTV-HPT-2b) (核酸分子 B、 図 1)	CMV-RNA1 (pBI-CR1) (核酸分子 A、 図 3 (A))	CMV-RNA2+目的遺伝子 (pBI-CR2Δ2b-GFP) (本発明の核酸分子、 図 3 (C))	CMV-RNA3 (pBI-CR3) (核酸分子 C、 図 3 (D))
接種植物体名				
CR1 形質転換植物体	-	-	○	○
CR1 形質転換植物体	○	-	○	○
CR3 形質転換植物体	-	○	○	-
CR3 形質転換植物体	○	○	○	-

○等量混合 , -混合せず

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

2 b タンパク質もしくは 2 b 遺伝子が植物体に存在しない場合には、G F P は葉脈にほとんどが局在する。一方、2 b 遺伝子を有するアグロバクテリウム菌体から 2 b を一過的に供給した場合は、いずれにおいても 2 b の存在下で、G F P が葉全体（葉脈 + 葉肉組織）で発現していることが確認できた。接種植物体における G F P 検出結果を図 5 に示す。

【 0 0 9 5 】

[実験 1 0]

C M V ゲノム R N A 1 + 2 b 遺伝子又は R N A 3 + 2 b 遺伝子を有する形質転換体の接種用植物体の作出

C M V の 2 b タンパク質の存在下で、目的遺伝子の G F P が葉全体（葉脈 + 葉肉組織）で発現していることが [実験 7] で確認できたことから、この 2 b タンパク質をコードする遺伝子と共に C M V のゲノム R N A 1 又は R N A 3 を発現する形質転換体（*Nicotiana benthamiana*）を作出するため、[実験 8] の方法で作出した形質転換体の T 1 個体を温室出育成し、受粉前の花の雌しべに、[実験 3] の方法で作出した 2 b 形質転換体の花粉を人工授粉させた。得られた種子は、1 2 5 m g / l カナマイシン及び 1 5 m g / l ハイグロマイシンを添加した M S 培地に無菌播種を行い、カナマイシン及びハイグロマイシンの両方に耐性が付与された植物体を選抜した後、芽生えを移植して温室内で土耕栽培による育成を行った。これらの個体の葉からゲノム DNA を抽出して、ゲノミック P C R 解析を実施し、C R 1 + 2 b 形質転換体は、p B I - C R 1 と 2 b 遺伝子の両方を有する形質転換植物体であること、C R 3 + 2 b 形質転換体は、p B I - C R 3 と 2 b 遺伝子の両方を有する形質転換植物体であることも確認済みである。

【 0 0 9 6 】

[実験 1 1]

C M V ゲノム R N A 1 + 2 b 遺伝子又は R N A 3 + 2 b 遺伝子を有する形質転換体の接種用植物体としての機能解析

1 2 5 m g / l カナマイシン及び 1 5 m g / l ハイグロマイシンを添加した M S 培地に無菌播種を行い、カナマイシン及びハイグロマイシンの両方に耐性が付与された植物体を選抜した後、芽生えを土耕栽培して温室内で育成を行った。播種後、約 2 ヶ月栽培した植物体に、[実験 6] の方法で、アグロインフィルトレーションを実施した。C R 1 + 2 b 形質転換体には、p B I - C R 2 2 b - G F P と p B I - C R 3 を有する 2 種類のアグロバクテリウム菌体溶液を 1 : 1 に等量混合して最終の懸濁液の菌体量を $O D_{600} = 0.6$ 値に調整した。また、C R 3 + 2 b 形質転換体の T 1 個体には、p B I - C R 1 と p B I - C R 2 2 b - G F P を有する 2 種類のアグロバクテリウム菌体溶液を 1 : 1 に等量混合した懸濁液の菌体量を最終濃度 $O D_{600} = 0.6$ 値に調整した。いずれも、組換植物体への接種には、針なしシリンジ又は真空デシケーターを用いて強制注入を行った。アグロインフィルトレーションによる接種後、[実験 7] の方法で、5 ~ 7 日間栽培を行った。その結果を以下の表 3 に示す。

【 0 0 9 7 】

10

20

30

【表 3】

表 3 接種植物体及び接種アグロバクテリウム菌体（保有ベクター）の組み合わせ
（○は等量混合、－は未混合菌体）

導入遺伝子 （プラスミド名）	アグロインフィルトレーションに用いる混合菌体セット	
	目的遺伝子+CMV-RNA 3 （pBI-CR2 Δ 2b-GFP, pBI-CR3） （本発明の核酸分子、図 3（C） 及び核酸分子 C、図 3（D））	目的遺伝子+CMV-RNA 1 （pBI-CR2 Δ 2b-GFP, pBI-CR1） （本発明の核酸分子、図 3（C） 及び核酸分子 A、図 3（A））
接種植物体名		
CR1 形質転換植物体	○	－
CR3 形質転換植物体	－	○

10

○等量混合

【 0 0 9 8 】

接種植物体における葉の GFP 検出結果を表す蛍光顕微鏡写真を図 6 に示す。図 6 は、CR1 + 2 b 形質転換体（左図）及び CR3 + 2 b 形質転換体（右図）にそれぞれアグロインフィルトレーションした後（接種後 5 日目）の葉の蛍光顕微鏡写真である。何れも GFP 落射蛍光装置 SZX - RFL 2（SZX fluorescence illumination system：オリンパス株式会社）を使用して GFP 蛍光写真を取得した。葉肉及び葉脈の何れでも、GFP 蛍光の発現が生じていることが明らかになった。

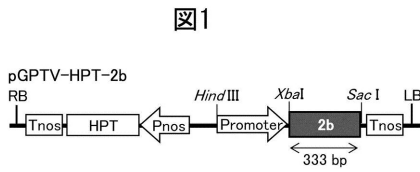
20

【産業上の利用可能性】

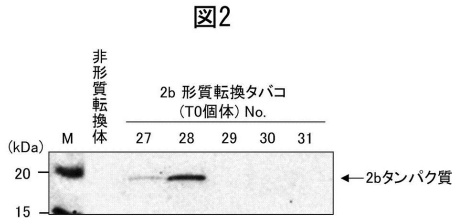
【 0 0 9 9 】

上述のように、本発明の遺伝子発現ベクター及び遺伝子改変植物を用いた方法によれば、植物体全体の細胞にベクターを移行・感染させて、目的遺伝子を高レベル発現させることが可能となる。また、種々の宿主植物や種々のサイズの目的遺伝子を対象として一過性発現を行うことが可能となる。従って、本発明は農学、農業生産工学、資源生産科学、生物生産工学等の産業分野において、高い利用可能性を有する。

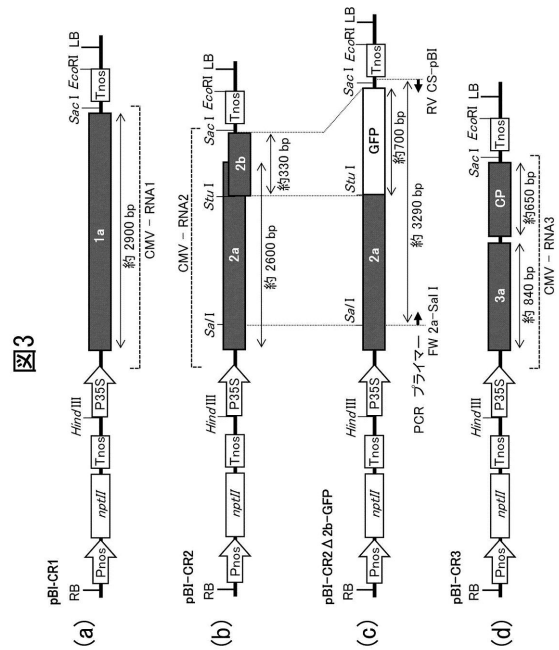
【 図 1 】



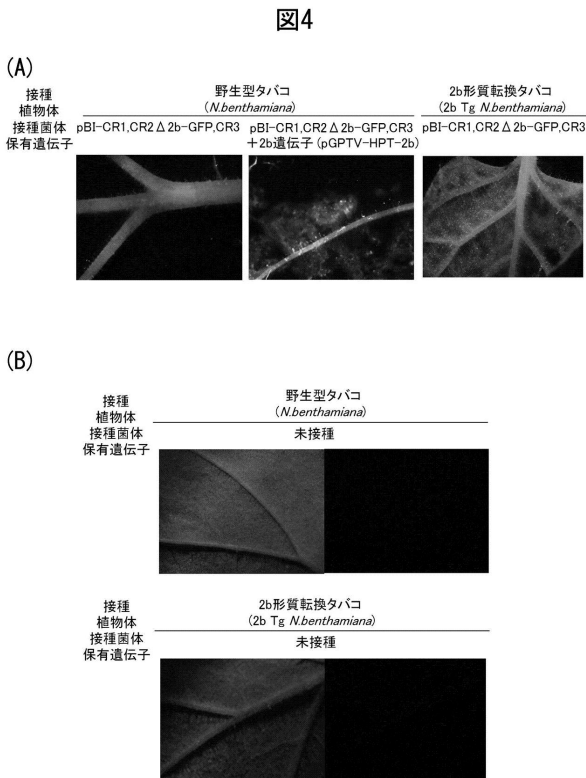
【 図 2 】



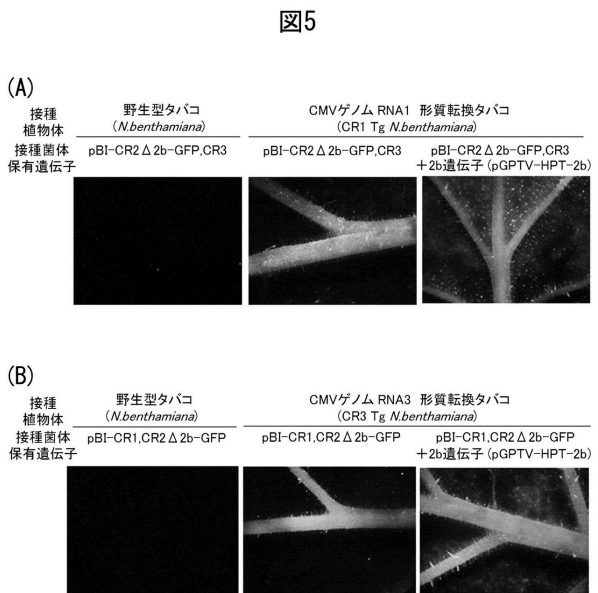
【 図 3 】



【 図 4 】

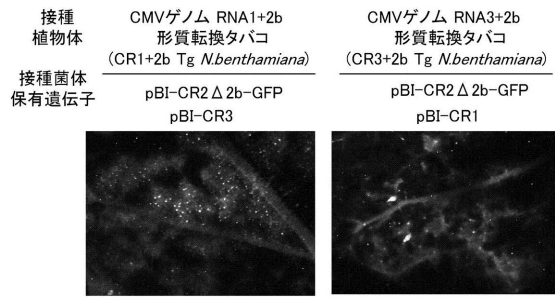


【 図 5 】



【 図 6 】

図6



【 配列表 】

0006350995000001 . app

フロントページの続き

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
- (72)発明者 松村 健
北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 国立研究開発法人産業技術総合研究所 北海道センター内
- (72)発明者 福澤 徳穂
北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 国立研究開発法人産業技術総合研究所 北海道センター内
- (72)発明者 一町田 紀子
北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 国立研究開発法人産業技術総合研究所 北海道センター内
- (72)発明者 増田 税
北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 特開2005-013164(JP,A)
特表2007-510423(JP,A)
特表2010-502203(JP,A)
Planta, 2007, Vol.225, p.277-286
FUJIKI M.et al., Development of a new cucumber mosaic virus-based plant expression vector with truncated 3a movement, Virology, 2008 Nov 10, 381(1), p.136-42
TAKESHITA M.et al., Infection dynamics in viral spread and interference under the synergism between Cucumber mosaic virus, Mol.Plant-Microbe Interact., 2012 Jan, 25(1), p.18-27

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

A01H 1/00

A01H 5/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)