(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
2010 年 6 月 3 日(03.06.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/061899 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/069977

(22) 国際出願日: 2009 年 11 月 26 日(26.11.2009)

(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 2008-304006 2008 年 11 月 28 日(28.11.2008) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北興化学工業株式会社 **(HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.)** [JP/JP]; 〒1038341 東京都中央区日本橋本石町四丁目４番２０号 Tokyo (JP). 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 **(NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEACH ORGANIZATION)** [JP/JP]; 〒3058517 茨城県つくば市観音台３－１－１ Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

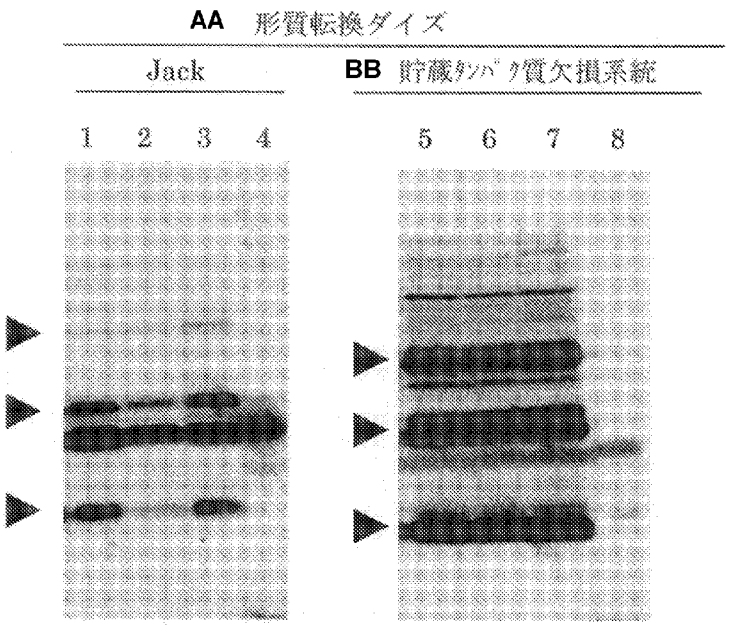
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 寺川 輝彦 **(TERAKAWA, Teruhiko)** [JP/JP]; 〒2430023 神奈川県厚木市戸田２１６５番地 北興化学工業株式会社 開発研究所内 Kanagawa (JP). 長谷川 久和 **(HASEGAWA, Hisakazu)** [JP/JP]; 〒2430023 神奈川県厚木市戸田２１６５番地 北興化学工業株式会社 開発研究所内 Kanagawa (JP). 石本 政男 **(ISHIMOTO, Masao)** [JP/JP]; 〒0628555 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘１番地 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター内 Hokkaido (JP). 内海 成 **(UTSUMI, Shigeru)** [JP/JP]; 〒6110011 京都府宇治市五ヶ庄 国立大学法人京都大学大学院 農学研究科内 Kyoto (JP). 東海林 幹夫 **(SHOJI, Mikio)** [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町１番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 瓦林 毅 **(KAWARABAYASHI, Takeshi)** [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町１番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP).

[続葉有]

(54) **Title**: TRANSFORMED SOYBEAN PLANT WHICH STORES VACCINE, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称 : ワクチンを蓄積する形質転換ダイズ植物およびその利用

[図4]



AA Transformed soybean
BB Storage protein deficit line

(57) **Abstract**: A transformed soybean plant, in which is introduced a gene which codes for a modified seed storage protein—for which a gene which codes for an Alzheimer's disease vaccine is inserted into a variable region of a gene which codes for a wild-type seed storage protein—is manufactured, and said vaccine is produced and stored in the seeds thereof.

(57) 要約: 野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換ダイズ植物を作製し、その種子中で該ワクチンを生産・蓄積させる。

WO 2010/061899 A1

(74) 代理人: 川口　嘉之，外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋３丁目４番１０号　アクロポリス２１ビル６階 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, 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 (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, 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)）

明　細　書

発明の名称 ：

ワクチンを蓄積する形質転換ダイズ植物およびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、種子中にアルツハイマー病ワクチンが蓄積することを特徴とする形質転換ダイズ植物と、その利用に関する。

背景技術

[0002] アルツハイマー病は、βアミロイド等の原因物質が脳内に蓄積し、神経細胞の傷害を引き起こすことによる神経変性疾患である。高齢化社会を迎えアルツハイマー病患者数の増加が予想される一方、予防薬や治療薬がほとんどなく、新たな予防薬、治療薬、ワクチン等の開発が望まれている。アルツハイマー病のワクチンは、その原因物質であるβアミロイドを抗原として開発されてきたが、副作用等の問題で開発が困難であった。そのため、副作用のないβアミロイド抗原決定基（エピトープ）を用いたワクチンの開発と大量生産技術の確立が必要とされている。

[0003] ダイズは胚乳を持たず、子葉に当たる胚にその養分を蓄積する無胚乳種子である。その胚にあたる種子容積全体の約４０%が貯蔵タンパク質でしめられる。そのため、ダイズはイネやトウモロコシ等の胚乳にデンプンを主要な貯蔵物質として蓄積する他の作物に比べて貯蔵組織として性質を異にしており、外来タンパク質を生産し蓄積させるのに適した作物である。ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質は１１Sグロブリン（グリシニン）と７Sグロブリン（β－コングリシニン）である。これらの種子貯蔵タンパク質の立体構造や細胞内での蓄積機構は解明されており、これらをコードする遺伝子には、可変領域と呼ばれる、外来の遺伝子を挿入しても３次元構造を維持することができ、貯蔵タンパク質の特性に影響を及ぼさないと考えられている部位が存在することが知られている。

[0004] βアミロイド抗原決定基は、一般的には数個のアミノ酸からなる比較的低

分子のタンパク質（ペプチド）であり、ペプチドを大量に生産させる目的で該ペプチドをコードする遺伝子をダイズに導入し、形質転換ダイズの種子に蓄積させようとしても細胞内のプロテアーゼ等の酵素によって分解がおこり、高度に蓄積させることは困難であった。

[0005] 一方で、生理活性ペプチドやワクチンを作物の種子に蓄積させる形質転換作物としては、血圧降下ペプチドを蓄積する形質転換ダイズ（特許文献１）、スギ花粉症ワクチンを蓄積する形質転換イネ（特許文献２）、βアミロイドを生産するジャガイモ（非特許文献１）、βアミロイドを生産するトマト（非特許文献２）が知られている。

[0006] しかしながら、βアミロイド抗原決定基（エピトープ）からなるアルツハイマー病ワクチンを高度に蓄積する形質転換ダイズと、該ダイズを用いた該ワクチンの大量生産方法については、これまで知られていなかった。

[0007] また、インゲンマメはダイズとともにマメ科に属する植物で種子中に含まれるタンパク質は２０％である。その主要な種子貯蔵タンパク質のひとつであるアルセリンはアルセリン１から７までの複数個の存在が知られており、それらの構造タンパク質をコードする部分の塩基配列の相同性は非常に高いことが知られている。アルセリンタンパク質の構造解析はダイズほど進んでおらず、アルセリン１と５の立体構造が明らかになっている程度である。

[0008] さらに、イネの主要な種子貯蔵タンパク質のひとつであるプロラミンは難消化性のタンパク質で分子量の異なる数種類（１０K、１３K、１６Kなど）のタンパク質が存在することが知られている。プロラミンの立体構造については明らかではない。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開２００６－２３８８２１号公報

特許文献2：特開２００４－３２１０７９号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｃｈ

emical Societies （２００５） ５７９巻、６７３７頁～６７４４頁

非特許文献2：Biotechnology Letters （２００８）３０巻、１８３９頁～１８４５頁

発明の概要

[0011] 本発明の目的は、種子中でアルツハイマー病ワクチンを生産・蓄積させることができる形質転換ダイズ植物を提供することにある。また、本発明の目的は、該形質転換ダイズを用いてアルツハイマー病ワクチンを生産する方法を提供することにある。

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。

その結果、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子が導入された形質転換ダイズ植物の作製に成功し、該形質転換ダイズ植物の種子中でアルツハイマー病ワクチンを生産させ、蓄積させることに成功した。

[0013] さらに、内在性の種子貯蔵タンパク質が欠損したダイズに前記改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換ダイズ植物が、その種子中にアルツハイマー病ワクチンを効率的に生産・蓄積することを見出した。

[0014] すなわち本発明は、

［１］改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子が導入された形質転換ダイズ植物であって、該改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子は、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子がフレームシフトを生じないように挿入されたものであり、該改変型種子貯蔵タンパク質は種子中で発現して蓄積することを特徴とする、形質転換ダイズ植物。

［２］前記アルツハイマー病ワクチンが、βアミロイド抗原決定基であることを特徴とする、［１］に記載の形質転換ダイズ植物。

［３］βアミロイド抗原決定基が配列番号３のペプチドが１～３個連結された配列からなる、［２］に記載の形質転換ダイズ植物。

［４］前記形質転換ダイズ植物は、内在性のダイズ１１Sグロブリン及び／又はダイズ７Sグロブリンを欠損していることを特徴とする［１］～［３］のいずれかに記載の形質転換ダイズ植物。

［５］前記野生型種子貯蔵タンパク質が、ダイズ１１Sグロブリンの Ａ１ａＢ１ｂサブユニット、インゲンマメのアルセリン又はイネのプロラミンであることを特徴とする、［１］～［４］のいずれかに記載の形質転換ダイズ植物。

［６］前記野生型種子貯蔵タンパク質が、配列番号２のアミノ酸配列、又は配列番号２のアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むものであり、前記アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された可変領域が、配列番号２におけるアミノ酸番号１１１～１２８、アミノ酸番号１９８～２１６、アミノ酸番号２６８～３１５、及びアミノ酸番号４９０～４９５に相当するアミノ酸配列の群から選択される１つ又は複数のアミノ酸配列をコードする領域である、［５］に記載の形質転換ダイズ植物。

［７］前記野生型種子貯蔵タンパク質が、配列番号３７のアミノ酸配列、又は配列番号３７のアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むものであり、前記アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された可変領域が、配列番号３７におけるアミノ酸番号１４９～１５０及び／またはアミノ酸番号２５０～２５１に相当するアミノ酸配列をコードする領域である、［５］に記載の形質転換ダイズ植物。

［８］前記野生型種子貯蔵タンパク質が、配列番号４５のアミノ酸配列、又は配列番号４５のアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むものであり、前記アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された可変領域が、配列番号４５におけるアミノ酸番号１１０～１１１に相当するアミノ酸配列をコードする領域である、［５］に記載の形質転換ダイズ植物。

［９］前記改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子はインゲンマメのアルセリン２プロモーターまたはダイズの１１ＳグロブリンのＡ１ａＢ１ｂサブユニットプロモーターによって発現制御された、［１］～［８］のいずれかに記載の形質転換ダイズ植物。

［１０］［１］～［９］のいずれかに記載の形質転換ダイズ植物の細胞。

［１１］［１］～［９］のいずれかに記載の形質転換ダイズ植物の種子。

［１２］［１１］に記載の種子を加工してなる、ダイズ種子加工品。

［１３］［１］～［９］のいずれかに記載の形質転換ダイズ植物を用いて、該形質転換ダイズ植物の種子中でアルツハイマー病ワクチンを生産する方法。

［１４］ダイズ種子特異的な発現を誘導するプロモーターと、該プロモーターの下流に連結された、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子がフレームシフトを生じないように挿入された改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子とを含むベクター。

［１５］前記プロモーターはインゲンマメのアルセリン２プロモーターまたはダイズの１１ＳグロブリンのＡ１ａＢ１ｂサブユニットプロモーターである、［１４］に記載ベクター、を提供する。

[0015] 本発明の形質転換ダイズ植物は、その種子にアルツハイマー病ワクチンを高度に蓄積させることができるので、該形質転換ダイズ植物を用いて、アルツハイマー病ワクチンを効率的に生産することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]ダイズグリシニンＡ1ａＢ1ｂサブユニットのアミノ酸配列における、可変領域がコードするアミノ酸配列を示した模式図である。

[図2]プラスミドpUHGA1aB1bMの構築手順を示す図。

[図3]改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子を組み込むために使用したプラスミドｐＵＨＧの構造を示した模式図である。ＳｍａＩサイトに任意の改変型種子貯蔵タンパク質の遺伝子を挿入する。

[図4]改変型Ａ１ａＢ１Ｍ１をコードする遺伝子を導入した形質転換ダイズ種子中へのβアミロイド抗原決定基の蓄積をウエスタンブロッティングで検出した写真である。各レーンの説明は以下の通り。１：品種JackへA1aB1M1を導入した形質転換ダイズ　10-2 No. 1；２：品種JackへA1aB1M1を導入した形質転換ダイズ　10-2 No. 2；３：品種JackへA1aB1M1を導入した形質転換ダイズ　10-2 No. 3；４：品種Jack（コントロール）；５：貯蔵タンパク質欠損系統へA1aB1M1を導入した形質転換ダイズ　16-2 No. 1；６：貯蔵タンパク質欠損系統へA1aB1M1を導入した形質転換ダイズ　16-2 No. 2；７：貯蔵タンパク質欠損系統へA1aB1M1を導入した形質転換ダイズ　16-2 No. 3；８：貯蔵タンパク質欠損系統（コントロール）

[図5]改変型アルセリンをコードする遺伝子（Arc5M1）を導入した形質転換ダイズ種子中へのβアミロイド抗原決定基の蓄積をウエスタンブロッティングで検出した写真である。各レーンの説明は以下の通り。１：品種JackへArc5M1を導入した形質転換ダイズ　2-1 No. 1　；２：品種JackへArc5M1を導入した形質転換ダイズ　2-1 No. 2　；３：品種JackへArc5M1を導入した形質転換ダイズ　2-2 No. 1　；４：品種JackへArc5M1を導入した形質転換ダイズ　2-2 No. 2

[図6]改変型プロラミンをコードする遺伝子（PR10M1）を導入した形質転換ダイズ種子中へのβアミロイド抗原決定基の蓄積をウエスタンブロッティングで検出した写真である。各レーンの説明は以下の通り。１：品種JackへPR10M1を導入した形質転換ダイズ　1-1 No. 1　；２：品種JackへPR10M1を導入した形質転換ダイズ　1-1 No. 2　；３：品種JackへPR10M1を導入した形質転換ダイズ　4-2 No. 1　；４：品種JackへPR10M1を導入した形質転換ダイズ　4-2 No. 2

[図7]改変型A1aB1M1またはA2PA1aB1bM3をコードする遺伝子を導入した形質転換ダイズ種子中へのβアミロイド抗原決定基の蓄積をウエスタンブロッティングで検出した写真である。各レーンの説明は以下の通り。１：貯蔵タンパク質欠損系統にA2PA1aB1bM1を導入した形質転換ダイズ系統4-6　；２：貯蔵タ

ンパク質欠損系統にA1aB1bM1を導入した形質転換ダイズ系統7-1；３：Jack品種にA1aB1bM1を導入した形質転換ダイズ系8-1　No.１；４：Jack品種にA1aB1bM1を導入した形質転換ダイズ系統8-1　No.２；５：貯蔵タンパク質欠損系統；６：貯蔵タンパク質欠損系統にA2PA1aB1bM3を導入した形質転換ダイズ系統3-1　No.１；７：貯蔵タンパク質欠損系統にA2PA1aB1bM3を導入した形質転換ダイズ系統3-1　No.2

[図8]Ａ１ａＢ１ｂＭ３形質転換ダイズ種子中のAβ4-10（配列番号３のアミノ酸配列からなるペプチド）の安定性評価の結果を示す図（写真）。各レーンの説明は以下の通り。Ａ－１、Ａ－２：熱無処理区；　Ｂ－１、Ｂ－２：焙煎処理区；　Ｃ－１、Ｃ－２：水煮処理区；　Ｄ－１、Ｄ－２：抽出溶液熱処理区

[図9]Ａβ４－１０の繰り返し数と抗体価の関係を評価した図（写真）。各レーンの説明は以下の通り。１．key-limpet-hemocyanin（ＫＬＨ）－Ｐ１精製抗体と基質Aβ４２（　４００ピコモル）との反応区；２．ＫＬＨ－Ｐ１精製抗体と基質Aβ４２（１０００ピコモル）との反応区；３．ＫＬＨ－Ｐ２精製抗体と基質Aβ４２（　４００ピコモル）との反応区；　４．ＫＬＨ－Ｐ２精製抗体と基質Aβ４２（１０００ピコモル）との反応区；５．ＫＬＨ－Ｐ３精製抗体と基質Aβ４２（　４００ピコモル）との反応区；６．ＫＬＨ－Ｐ３精製抗体と基質Aβ４２（１０００ピコモル）との反応区

発明を実施するための形態

[0017]　以下に、本発明を詳細に説明する。

[0018]　１．野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子

本発明における野生型種子貯蔵タンパク質としては、ダイズの１１Sグロブリンを構成する各サブユニット、ダイズの７Sグロブリンを構成する各サブユニット、インゲンマメのアルセリン、イネのプロラミン、イネのグロブリン、更には他の作物の種子貯蔵タンパク質が挙げられる。好ましい野生型種子貯蔵タンパク質としては、ダイズの１１SグロブリンのＡ１ａＢ１ｂサブユニット、７Sグロブリンのαサブユニットもしくはβサブユニットが挙げられる

が、ダイズの１１Sグロブリンの Ａ１ａＢ１ｂサブユニットがより好ましい。

[0019] さらに、本発明における野生型種子貯蔵タンパク質として、配列番号２、配列番号３７もしくは配列番号４５のアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列と８０%以上、好ましくは９０%以上、より好ましくは９５%以上の同一性（ｉｄｅｎｔｉｔｙ）を有するアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。

[0020] ここで、アミノ酸配列の同一性（%）とは、比較する２つのアミノ酸配列を必要に応じて間隙を導入して整列（アラインメント）させ、得られる最大のアミノ酸配列の同一性（%）をいう。アミノ酸配列の同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の周知の種々の方法を用いて行うことができ、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアや、Ｇｅｎｅ Ｗｏｒｋｓ ２．５．１ソフトウェア（（株）帝人システムテクノロジー）、ＧＥＮＥＴＩＸ－ＷＩＮ（ソフトウェア開発（株））等の市販のソフトウェアを使用することもできる。

[0021] 本発明における野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子としては、ダイズの１１Sグロブリンを構成する各サブユニットをコードする遺伝子、ダイズの７Sグロブリンを構成する各サブユニットをコードする遺伝子、インゲンマメのアルセリンをコードする遺伝子、イネのプロラミンをコードする遺伝子、イネのグロブリンをコードする遺伝子、更には他の作物の種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子等が挙げられる。好ましい遺伝子としては、ダイズの１１Sグロブリンの Ａ１ａＢ１ｂサブユニットをコードする遺伝子や、７Sグロブリンのαサブユニットもしくはβサブユニットをコードする遺伝子が挙げられるが、ダイズの１１Sグロブリンの Ａ１ａＢ１ｂサブユニットをコードする遺伝子がより好ましい。

[0022] さらに、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子として、配列番号１、配列番号３６もしくは配列番号４４の塩基配列、又はこれらの塩基配列と８０%以上、好ましくは９０%以上、より好ましくは９５%以上の同一性

（ｉｄｅｎｔｉｔｙ）を有する塩基配列を含む遺伝子が挙げられる。

[0023] ここで、塩基配列の同一性（%）とは、比較する２つの塩基配列を必要に応じて間隙を導入して整列（アラインメント）させ、得られる最大の塩基配列の同一性（%）をいう。塩基配列の同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の周知の種々の方法を用いて行うことができ、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアや、Ｇｅｎｅ Ｗｏｒｋｓ ２．５．１ソフトウェア（（株）帝人システムテクノロジー）、ＧＥＮＥＴＩＸ－ＷＩＮ（ソフトウェア開発（株））等の市販のソフトウェアを使用することもできる。

[0024] ２．改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子

本発明における改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子とは、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子がフレームシフトを生じないように挿入されたものである。

[0025] ここで、「アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子がフレームシフトを生じないように挿入された」とは、改変型種子貯蔵タンパク質のアミノ酸配列のうち、アルツハイマー病ワクチンのアミノ酸配列を除いた配列が、対応する野生型種子貯蔵タンパク質のアミノ酸配列と同一となるように、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入されたことをいう。

[0026] さらに、「アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された」とは、可変領域をコードする塩基配列を欠損することなくアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入されたことの他、可変領域をコードする塩基配列の全部又は一部がアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子と置換されたことをも含む。

[0027] 本発明において、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域とは、その中に外来遺伝子が挿入された場合であっても、フレームシフト

を生じないように挿入されていれば、その遺伝子発現産物であるタンパク質が、野生型種子貯蔵タンパク質と同等の安定した３次元構造を維持することができ、それにより野生型種子貯蔵タンパク質の特性を維持することができる領域をいう。

[0028] 例えば、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子が、配列番号２のアミノ酸配列を含むダイズの１１Sグロブリンの Ａ１ａＢ１ｂサブユニットをコードする遺伝子である場合には、配列番号２のアミノ酸番号２０～２８をコードする領域（可変領域I）、アミノ酸番号１１１～１２８をコードする領域（可変領域II）、アミノ酸番号１９８～２１６をコードする領域（可変領域III）、アミノ酸番号２６８～３１５をコードする領域（可変領域IV）、アミノ酸番号４９０～４９５をコードする領域（可変領域V）の５ヶ所が可変領域として知られている（図１）。

[0029] また、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子が、配列番号２のアミノ酸配列に1個又は複数個のアミノ酸の置換、挿入、付加及び／又は欠失が存在する、配列番号２のアミノ酸配列と同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである場合には、配列番号２のアミノ酸番号２０～２８に相当するアミノ酸配列をコードする領域、アミノ酸番号１１１～１２８に相当するアミノ酸配列をコードする領域、アミノ酸番号１９８～２１６に相当するアミノ酸配列をコードする領域、アミノ酸番号２６８～３１５に相当するアミノ酸配列をコードする領域、アミノ酸番号４９０～４９５に相当するアミノ酸配列をコードする領域が可変領域となる。

[0030] ここで、特定のアミノ酸配列に「相当するアミノ酸配列」とは、最大のアミノ酸配列の同一性（%）が得られるように、比較する２つのアミノ酸配列を必要に応じて間隙を導入して整列（アラインメント）させたときの、一方の特定の部分アミノ酸配列に対応する他方の部分アミノ酸配列をいい、このようなアミノ酸配列は当業者であれば容易に特定することができる。

[0031] 野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子に複数の可変領域が存在する場合には、１つ又は複数の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコード

する遺伝子を挿入することで、改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子を調製することができる。

[0032] 例えば、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子として、配列番号２のアミノ酸配列を含むダイズの１１Sグロブリンの Ａ１ａＢ１ｂサブユニットをコードする遺伝子を用いる場合には、アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子を挿入する好ましい可変領域として、可変領域II、III、IV、Vのいずれかを選択することができるが、IIIに挿入することがより好ましい。また、アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子を挿入する可変領域として、可変領域II、III、IV、Vのうち２以上の領域を選択することもでき、例えば、IIとIIIとIVの３つの領域に同時に挿入することや、IIとIIIとIVとVの４つの領域に同時に挿入すること等もできる。ここで、アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子は、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする塩基配列にフレームシフトが生じないように導入する必要がある。

[0033] また、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子として、配列番号３７のアミノ酸配列を含むインゲンマメのアルセリン５をコードする遺伝子を用いる場合には、可変領域については知られていないため、Ａ１ａＢ１ｂサブユニットとのＤＮＡ配列を比較してディスオーダー領域を確認し、更にアミノ酸配列及び立体構造を他の類似貯蔵タンパクと比較し、配列のギャップ及び構造上の違いを確認することによって、可変領域を推定する必要がある。このような推定により特定される配列番号３７のアミノ酸番号１４９～１５０をコードする領域（可変領域Ａ）及び／又はアミノ酸番号２５０～２５１をコードする領域（可変領域Ｂ）にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子を挿入することが好ましい。

[0034] また、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子が、配列番号３７のアミノ酸配列に1個又は複数個のアミノ酸の置換、挿入、付加及び／又は欠失が存在する、配列番号３７のアミノ酸配列と同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである場合には、配列番号３７のアミノ酸番号１４９～１５０に相当するアミノ酸配列をコードする領域、アミノ酸番号

２５０～２５１に相当するアミノ酸配列をコードする領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子を挿入することが好ましい。

[0035] さらに、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子として、配列番号４５のアミノ酸配列を含むイネのプロラミンをコードする遺伝子を用いる場合には、立体構造および可変領域については知られていないため、アミノ酸配列を他の類似貯蔵タンパクと比較し、ギャップ構造を確認することによって、可変領域を推定する必要がある。このような推定により特定される配列番号４５のアミノ酸番号１１０～１１１をコードする領域（可変領域ａ）にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子を挿入することが好ましい。

[0036] また、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子が、配列番号４５のアミノ酸配列に1個又は複数個のアミノ酸の置換、挿入、付加及び／又は欠失が存在する、配列番号４５のアミノ酸配列と同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである場合には、配列番号４５のアミノ酸番号１１０～１１１に相当するアミノ酸配列をコードする領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子を挿入することが好ましい。

[0037] ３．アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子

本発明においてアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子とは、アルツハイマー病に対するワクチンとしての活性を有するタンパク質又はペプチドをコードするＤＮＡであれば特に限定はされないが、βアミロイドの一部を構成する、約５～２５アミノ酸から成るペプチドからなるβアミロイド抗原決定基をコードするＤＮＡであることが好ましい。このようなＤＮＡとして、例えば配列番号３のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ等が挙げられる。

[0038] βアミロイドをコードする塩基配列は公知（ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＡＢ１１３３４９）であるため、この塩基配列情報をもとに、ｃＤＮＡライブラリーからβアミロイドやβアミロイド抗原決定基をコードするＤＮＡをスクリーニング操作によって単離することができる。また、βアミロイド抗原決定基をコードするＤＮＡは化学合成により作製することもできる。

[0039] また、本発明においてアルツハイマー病ワクチンは、これをコードする遺伝子をタンデムに複数連結させた状態で種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域に挿入し、発現させることもできる。例えば、βアミロイド抗原決定基をコードする遺伝子を、１～２０の整数個、好ましくは１～５の整数個、より好ましくは１～３の整数個、特に好ましくは２個連結させたものを可変領域にフレームシフトを生じないように挿入することができる。

[0040] また、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子を挿入するにあたり、該アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子の５’末端及び／又は３’末端にプロテアーゼ認識配列をコードする塩基配列を付加することもできる。これにより、種子中で産生された改変型種子貯蔵タンパク質からアルツハイマー病ワクチンをプロテアーゼにより切り出すことが可能になる。このようなプロテアーゼとして、例えばサーモリシンが挙げられる。

[0041] ４．遺伝子導入用ベクター

本発明に係る遺伝子導入用のベクターは、該遺伝子の上流にダイズ種子特異的な発現を誘導するプロモーターを連結した構造にすることができる。さらに、該遺伝子の下流にターミネーターを連結させることもできる。

[0042] ダイズ種子特異的な発現を誘導するプロモーターとしては、例えばダイズの１１Ｓグロブリンのプロモーター、インゲンマメのアルセリンのプロモーター等が挙げられ、ターミネーターとしては、ダイズの１１Ｓグロブリンのターミネーター、インゲンマメのアルセリン２のターミネーター、カリフラワーモザイクウイルスの３５ＳのターミネーターやＮＯＳターミネーター等が挙げられる。

ダイズの１１Ｓグロブリンのプロモーターとしては、配列番号１８からなるダイズの１１Sグロブリン Ａ１ａＢ１ｂサブユニットのプロモーターが挙げられ、種子特異的プロモーター活性を有する限り、この配列と９５%以上の同一性を有するものであってもよい。ダイズの１１Ｓグロブリンのターミネーターとしては、配列番号２１からなるダイズの１１ＳグロブリンＡ１ａＢ

１ｂサブユニットのターミネーターが挙げられ、種子特異的ターミネーター活性を有する限り、この配列と９５％以上の同一性を有するものであってもよい。

インゲンマメのアルセリンのプロモーターとしては、配列番号５６の塩基番号１３９９～３８６０からなるインゲンマメアルセリン２のプロモーターが挙げられ、種子特異的プロモーター活性を有する限り、この配列と９５％以上の同一性を有するものであってもよい。インゲンマメのアルセリンのターミネーターとしては、配列番号５９からなるインゲンマメアルセリン２のターミネーターが挙げられ、種子特異的ターミネーター活性を有する限り、この配列と９５％以上の同一性を有するものであってもよい。

[0043] 本発明に係るベクターには、組換え体を選抜するための選抜マーカー遺伝子や導入された遺伝子の発現を確認するためのレポーター遺伝子を挿入することができる。選抜マーカー遺伝子としては、例えばハイグロマイシン耐性遺伝子、ホスフィノスリシン耐性遺伝子等が挙げられ、レポーター遺伝子としては、例えばβ－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）遺伝子や、ルシフェラーゼ（ＬＵＣ）遺伝子、ＧＦＰ遺伝子等が挙げられる。

[0044] 本発明に係るベクターは、種子特異的な発現を誘導するプロモーターと、その下流に連結された改変型貯蔵タンパク質をコードする遺伝子と、さらにその下流に連結されたターミネーターを含むＤＮＡ断片を、前記選抜マーカー遺伝子及び／又はレポーター遺伝子を含むベクターに挿入して得ることもできる。

[0045] ５．形質転換され得るダイズ植物

本発明において形質転換され得るダイズには、一般に食用、飼料、油用として利用されている品種が含まれる。また、形質転換されるダイズは、内在性の種子貯蔵タンパク質の一部又は全部が欠損していることが好ましく、例えば、ダイズ１１Sグロブリン及び／又はダイズ７Sグロブリンの一部又は全部が欠損しているダイズが挙げられる。ここで、「一部か欠損している」と

は、野生型に比べて発現量が少ないことの他、一部のサブユニットのみが完全に欠損している場合や、一部のサブユニットのみの発現量が野生型に比べて少ない場合も含まれる。具体的には、ダイズ１１Ｓグロブリンを欠損している変異系統ＥｎＢ１、ダイズ７Ｓグロブリンを欠損している変異系統ＱＹ２、ダイズ１１Ｓグロブリン及びダイズ７Ｓグロブリンの両方を欠損している変異系統ＱＦ２などが挙げられる。さらに、これらの欠損変異系統と一般的な品種（例えばＪａｃｋ等）との交配による後代系統も挙げられる。

[0046] 内在性のダイズ１１Sグロブリン及び／又はダイズ7Sグロブリンの一部又は全部を欠損していることの確認は、種子から調製した貯蔵タンパク質の電気泳動法等で行うことができる。

[0047] ６．形質転換ダイズ植物の作製

形質転換ダイズ植物を作製するための材料として、例えば、根、茎、葉、種子、胚、胚珠、子房、茎頂、葯、花粉等の植物組織やその切片、未分化のカルス、不定胚、プロトプラスト等の植物培養細胞等を用いることができる。

[0048] 上記材料への改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の導入は、すでに報告され、確立されている種々の方法により行うことができるが、アグロバクテリウム法、ＰＥＧ法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、ウイスカー超音波法などを用いて前述した遺伝子導入用ベクターを導入することが好ましい。

[0049] 改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子を導入された材料の中から、選抜マーカー遺伝子によってもたらされる耐性効果を指標に、形質転換ダイズ植物の細胞を選抜することができる。選抜した細胞から、それぞれの植物種で報告されている植物体を再生させる工程を経て、形質転換ダイズ植物体を得ることができる。

[0050] こうして得られた形質転換ダイズ植物体の栽培を行い、種子を稔実させることで、本発明に係る形質転換ダイズの種子を得ることができ、該形質転換種子中に目的とするアルツハイマー病ワクチンが得られる。

[0051] アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が植物体に導入されているか否かの確認は、ＰＣＲ法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法、ウエスタンブロッティング法などによって行うことができる。例えば、形質転換ダイズ植物体の種子からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行い、アルツハイマー病ワクチンに特異的な一次抗体及び西洋わさび過酸化酵素（ＨＲＰ）などで標識した二次抗体を用いて免疫染色を行うことにより、アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子の導入が適切に行われ、アルツハイマー病ワクチンが種子に蓄積されていること、及びその蓄積量を確認することができる。

[0052] 形質転換ダイズ植物の種子中に蓄積した改変型種子貯蔵タンパク質に含まれるアルツハイマー病ワクチンの性能は、例えばアルツハイマー病を発症する疾患モデルマウスを用いて評価することができる。具体的には、皮下注射または経口投与によりアルツハイマー病ワクチンを含む改変型種子貯蔵タンパク質、又はこれをプロテアーゼにより切断して精製したアルツハイマー病ワクチンを前記モデルマウスに投与し、該マウスのアルツハイマー病ワクチンに対する抗体産生、βアミロイド量、脳組織、行動異常を調べることで、アルツハイマー病ワクチンの性能を評価することができる。前記アルツハイマー病ワクチンを含む改変型種子貯蔵タンパク質、又はこれをプロテアーゼにより切断して精製したアルツハイマー病ワクチンは、アジュバンドと混合して投与することもできる。

[0053] アルツハイマー病ワクチンは、該ワクチンを含む改変型種子貯蔵タンパク質を蓄積する形質転換ダイズの種子を、屋外の圃場または人工的に環境が制御された閉鎖型栽培施設で大量に栽培し、採種することにより大量に生産することができる。

[0054] さらにアルツハイマー病ワクチンを含む改変型種子貯蔵タンパク質を蓄積する種子は、アルツハイマー病ワクチンを含む組成物として、アルツハイマー病の予防、治療に利用することができる。例えば、粉砕等の加工をした種子を、錠剤、顆粒状、粉末状、カプセル状、飲料等の形態とすることができ

る。

[0055] また、前記組成物は、種子に蓄積された改変型種子貯蔵タンパク質を抽出、精製したものを含むものであってもよい。例えば、種子の粉砕物を脱脂、加熱処理した後、液体クロマトグラフィー等の機器によって目的のアルツハイマー病ワクチンを含む改変型種子貯蔵タンパク質を精製することができる。さらに、前記組成物は、改変型種子貯蔵タンパク質をプロテアーゼで処理して精製することで、改変型種子貯蔵タンパク質から野生型種子貯蔵タンパク質部分の全部又は一部を取り除き、精製したアルツハイマー病ワクチンを含むものであってもよい。

[0056] 以下に、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

なお、以下の実施例で行われる実験操作の手順は、特に記述しない限り、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ」第２版（Ｊ．　Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　ｐｒｅｓｓ，　１９８９年発行）に記載される方法に従っている。

実施例

[0057] ［実施例１］

<u>改変型ダイズ１１Ｓグロブリン Ａ１ａＢ１ｂの発現プラスミドの構築</u>

βアミロイド抗原決定基として知られる配列番号３のアミノ酸配列からなるペプチド（以下Ａβ４－１０と略す）を含む改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子をダイズ種子中で発現させるための発現プラスミドを構築した。手順を図２に示した。

[0058] Ａβ４－１０をコードする塩基配列をタンデムに３つ連結したオリゴヌクレオチド（センス鎖、配列番号４）及びその相補配列からなるオリゴヌクレオチド（アンチセンス鎖、配列番号５）を、株式会社ファスマックのカスタムＤＮＡ受託合成サービスを利用して合成した（センス鎖を４１０Ｆ、アンチセンス鎖を４１０Ｒと呼ぶ）。以降、特に記述がない限りオリゴヌクレオチドは、同社のカスタムＤＮＡ受託合成サービスを利用して合成した。４１

０Ｆおよび４１０Ｒの各１００ｐｍｏｌを、それぞれ最終濃度１ｍＭのＡＴＰ存在下でＴ４　Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｋｉｎａｓｅ（タカラバイオ社製）でリン酸化反応を行い、反応後の各反応液を混合し、９４℃で１０分間加熱後、一時間かけて３７℃まで徐々に冷却しアニーリングを行った。こうしてＡβ４－１０が３つ連なったペプチド（Ａβ４－１０）×３）をコードする二本鎖ＤＮＡ断片を得た。

[0059] 公知のＡ１ａＢ１ｂ遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＢ１１３３４９）のｃＤＮＡがｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）のＳｍａＩサイトにクローニングされているプラスミドｐＢＳＫ－Ａ１ａＢ１ｂ（京都大学から入手）を鋳型として、ベクター部分を含み、Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子の特定の可変領域が５’末端及び３’末端となるようにＰＣＲを用いて増幅し、得られたＤＮＡ断片と、（Ａβ４－１０）×３をコードする前記二本鎖ＤＮＡ断片とを連結して改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子を含むプラスミドを作製した。具体的な方法を以下に示す。

[0060] 配列番号１のＡ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子の可変領域IIに挿入するための、配列番号６及び７のプライマーペアからなるプライマーセット（ＰＳ－１）、可変領域IIIに挿入するための、配列番号８及び９のプライマーペアからなるプライマーセット（ＰＳ－２）、可変領域IVに挿入するための、配列番号１０及び１１のプライマーペアからなるプライマーセット（ＰＳ－３）と配列番号１２及び１３のプライマーペアからなるプライマーセット（ＰＳ－４）、可変領域Vに挿入するための配列番号１４及び１５のプライマーペアからなるプライマーセット（ＰＳ－５）の計５つのプライマーセットを調製した。ここで、プライマーの合成に当たっては、改変型Ａ１ａＢ１ｂタンパク質から（Ａβ４－１０）×３をプロテアーゼの一種であるサーモリシンにより切り出すことができるように、挿入領域直後にアミノ酸置換を導入するための塩基置換を導入した。

[0061] 上記各プライマーセットを用いて（Ａβ４－１０）×３をコードするＤＮ

Ａが挿入される配列番号１の塩基配列領域を、それぞれＰＳ－１領域、ＰＳ－２領域、ＰＳ－３領域、ＰＳ－４領域、ＰＳ－５領域と呼ぶ。

[0062] ＰＣＲは、ｐＢＳＫ－Ａ１ａＢ１ｂの１０ｎｇを鋳型とし、一反応あたり５０μｌの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを５７℃で３０秒及び伸長反応を６８℃で５分を１サイクルとして２５サイクル行った。なお、反応液は２００μＭのｄＮＴＰ混合液、１．５ｍＭのＭｇＳＯ$_4$溶液、１μＭの上記各プライマー、1ユニットのＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（東洋紡績社製）を含むＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ．２バッファーを含んでいる。以降ＰＣＲはプライマーを除き、特に記述がない限り同組成を用いて行った。

[0063] こうして得られた各ＤＮＡ断片の５０ｆｍｏｌと上記の（Ａβ４－１０）×３をコードする二本鎖ＤＮＡ断片の１５０ｆｍｏｌとを、ＤＮＡライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて、１６℃で４０分間連結反応を行った。反応産物を大腸菌ＤＨ５αコンピテントセル（タカラバイオ社製）に形質転換し、複数の形質転換大腸菌を得た。得られた大腸菌より、プラスミドＤＮＡを抽出精製し、株式会社ファスマックのＤＮＡシーケンシングサービスを用いて塩基配列の解析を行った。ＰＳ－１を用いたケースでは形質転換大腸菌１２クローンの塩基配列解析の結果、（Ａβ４－１０）×３をコードする二本鎖ＤＮＡ断片が順方向で正しく１分子挿入されていたのは１クローンであった。また、ＰＳ－２を用いたケースでは２４クローン、ＰＳ－３を用いたケースでは５４クローン、ＰＳ－４を用いたケースでは３０クローン、ＰＳ－５を用いたケースでは１２クローンを解析し、（Ａβ４－１０）×３をコードする二本鎖ＤＮＡ断片が順方向で正しく１分子挿入されたクローンが１つずつ得られた。挿入部位により、正しく挿入された改変型Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子を得られる確率が異なり、ＰＳ－３を用いたケースは特に挿入が困難であった。

[0064] このように作製された全ての改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子について塩基配列の確認を行った。以降、特に記述がない限り塩基配列の決定は

株式会社ファスマックのシーケンシングサービスを用いて行った。

[0065] 次に、複数の可変領域に（Ａβ４－１０）×３をコードするＤＮＡが挿入された改変型Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子を作製するため、上記で作製した改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子を鋳型として前記と同様のプライマーセットを用いてＰＣＲを行い、得られたＤＮＡ断片と上記の（Ａβ４－１０）×３ペプチドをコードする二本鎖ＤＮＡ断片との連結反応を繰り返して行い、改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子を作製した。こうして、Ａ１ａＢ１ｂの遺伝子の複数の可変領域に（Ａβ４－１０）×３をコードするＤＮＡが挿入された改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子を含むプラスミドを作製した。具体的な挿入領域とそれらに対応する改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子の名称を表１に示す。

[0066] [表1]

表１

名称	（Ａβ４－１０）×３をコードするＤＮＡの挿入部位および個数
Ａ１ａＢ１ｂＭ１	ＰＳ－１領域、ＰＳ－２領域、ＰＳ－４領域にそれぞれ１つ
Ａ１ａＢ１ｂＭ２	ＰＳ－１領域に１つ
Ａ１ａＢ１ｂＭ３	ＰＳ－２領域に１つ
Ａ１ａＢ１ｂＭ４－１	ＰＳ－３領域に１つ
Ａ１ａＢ１ｂＭ４－２	ＰＳ－４領域に１つ
Ａ１ａＢ１ｂＭ５	ＰＳ－１領域、ＰＳ－２領域、ＰＳ－３領域、ＰＳ－４領域、ＰＳ－５領域にそれぞれ１つ

[0067] 上記で作製した改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子をダイズ種子特異的に発現させるために、野生型Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子のプロモーター領域およびターミネーター領域の単離を行った。

[0068] Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子のプロモーターの部分配列である６３９ｂｐを含む公知のＡ１ａＢ１ｂ遺伝子ゲノムの部分配列（ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｘ１５１２１）のプロモーター領域をプローブとして、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、北海道農業研究センターが保有するミスズダイズＴＡＣライブラリー（www.kazusa.or.jp/ja/plant/PG2HP Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ｂａｃｔｅｒｉａｌ

ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ）からスクリーニングを行った。得られたクローンの塩基配列を解析した結果、Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子の翻訳開始点の上流２２０２ｂｐのプロモーター領域を含むことが明らかになった。得られた塩基配列をもとに、プロモーター領域を単離するため、配列番号１６及び１７のオリゴヌクレオチド対からなるプライマーセットを作製しＰＣＲを行った。

[0069] ＰＣＲは、ミスズダイズのゲノムＤＮＡを鋳型として、一反応あたり５０μｌの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを５７℃で３０秒及び伸長反応を６８℃で２分３０秒を１サイクルとして２５サイクル行った。こうして、Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子の２２０２ｂｐのプロモーター断片（Ｇｙ１Ｐ）（配列番号１８）を得た。

[0070] 次に、公知の野生型Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子ゲノムの部分配列（ＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｘ５３４０４）をもとに、Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子のターミネーター領域を単離するため、配列番号１９及び２０からなるプライマーセットを作製しＰＣＲを行った。

[0071] ＰＣＲは、ミスズダイズのゲノムＤＮＡを鋳型として、一反応あたり５０μｌの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを５７℃で３０秒及び伸長反応を６８℃で１分を１サイクルとして２５サイクル行った。こうして、野生型Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子の１０５２ｂｐのターミネーター断片（Ｇｙ１Ｔ）（配列番号２１）を得た。

[0072] 改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子を種子特異的に発現させるため、上記で得られた、各種改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子、Ｇｙ１ＰおよびＧｙ１Ｔを公知のｐＵＨＧベクター（Ｙ．　Ｋｉｔａ，Ｋ．　Ｎｉｓｈｉｚａｗａ，Ｍ　Ｔａｋａｈａｓｈｉ，　Ｍ．Ｋｉｔａｙａｍａ，　Ｍ．Ｉｓｈｉｍｏｔｏ．　（２００７）Ｇｅｎｅｔｉｃ　ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔ　ｏｆ　ｓｏｍａｔｉｃ　ｅｍｂｒｙｏｇｅｎｅｓｉｓ　ａｎｄ　ｒｅｇ

ｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｉｎ ｓｏｙｂｅａｎ ａｎｄ ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｂｒｅｅｄｉｎｇ ｌｉｎｅｓ．Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ２６：４３９－４４７）（図３）に連結し、発現プラスミドの構築を行った。

[0073] 上記のうち５種類の改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードするＤＮＡ断片を得るため、上記Ａ１ａＢ１ｂＭ２（配列番号２２）、Ａ１ａＢ１ｂＭ３（配列番号２４）、Ａ１ａＢ１ｂＭ４－１（配列番号２６）、Ａ１ａＢ１ｂＭ１（配列番号２８）、Ａ１ａＢ１ｂＭ５（配列番号３０）を鋳型に、配列番号３２及び３３のオリゴヌクレオチド対からなるプライマーセットを用いてＰＣＲを行った。

[0074] ＰＣＲは、一反応あたり５０μｌの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを５７℃で３０秒及び伸長反応を６８℃で２分を１サイクルとして２５サイクル行った。こうして、各改変型Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子のＤＮＡ断片を得た。

[0075] 改変型Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子のＤＮＡ断片、プロモーターＤＮＡ断片、ターミネーターＤＮＡ断片はリン酸化反応後、あらかじめＳｍａＩで切断後ＣＩＡＰ（タカラバイオ社製）で脱リン酸化反応を行ったｐＵＨＧベクターと連結反応を行った。得られたクローンからＧｙ１Ｐプロモーター、改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子、Ｇｙ１Ｔターミネーターの順に正しく連結されたクローンを、塩基配列を解析することによって選択した。

[0076] こうして、改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子が種子特異的に発現する以下の植物形質転換ベクター５種（ｐＵＨＧ Ａ１ａＢ１ｂＭ１、ｐＵＨＧＡ１ａＢ１ｂＭ２、ｐＵＨＧＡ１ａＢ１ｂＭ３、ｐＵＨＧＡ１ａＢ１ｂＭ４－１、ｐＵＨＧＡ１ａＢ１ｂＭ５）を構築した。

[0077] ［実施例２］

改変型インゲンマメのアルセリンの発現プラスミドの構築

Ａβ４－１０がタンデムに２つ連なったペプチド（以降（Ａβ４－１０）×２と略す）をコードするＤＮＡを挿入してなる改変型アルセリンをコード

する遺伝子をダイズ種子中で発現させるための発現プラスミドを構築した。

[0078] 公知のインゲンマメアルセリン５－１をコードする遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｚ５０２０２）（配列番号３６）の可変領域は明らかになっていないため、可変領域の推定を行った。Ａ１ａＢ１ｂとのＤＮＡ配列の比較で可変領域を推定すると、ディスオーダー領域はＣ末端に限定されていることが明らかとなった。そのため、ペプチド配列をＣ末端に挿入することは可能と考えられた。更に可変領域を特定するために、アルセリンと同様に２Ｓアルブミンに属するファイトヘマグルチニンと比較すると、ファイトヘマグルチニンに認められる８～１０残基からなるループ構造がＡｒｃ５－１における該当部位のリジン（配列番号３７のアミノ酸番号１４９）の後方に認められなかった。従ってこの部位（アミノ酸番号１４９～１５０）をコードする配列番号３６の塩基配列領域を可変領域Ａと推定した。つぎにアルセリン１及びインゲンマメの貯蔵タンパク質の一つであるファゼオリンと比較を行った。その結果、配列番号３７のアミノ酸番号２５０番目に当たるアスパラギン後に、７残基のギャップが認められた。従ってこの部位（アミノ酸番号２５０～２５１）をコードする塩基配列領域を可変領域Ｂと推定した。

[0079] 次に（Ａβ４－１０）×２をコードするＤＮＡを、Ａｒｃ５－１をコードする遺伝子の推定した可変領域に組み込むため、（Ａβ４－１０）×２をコードするオリゴヌクレオチド（４２０Ｆ、配列番号３４）とその相補的なオリゴヌクレオチド（４２０Ｒ、配列番号３５）を合成した。

[0080] ４２０Ｆおよび４２０Ｒの各１００ｐｍｏｌをそれぞれ、最終濃度１ｍＭのＡＴＰ存在下でＴ４ Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｋｉｎａｓｅ（タカラバイオ社製）でリン酸化反応を行い、反応後の各反応液を混合し、９４℃で１０分間加熱後、一時間で３７℃まで冷却しアニーリングを行い、（Aβ４－１０）×２をコードする二本鎖ＤＮＡ断片を得た。

[0081] Ａｒｃ５－１をコードするｃＤＮＡがｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）のＳｍａＩサイトにクローニングされている

プラスミドｐＢＳＫ－Ａｒｃ５－１（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、北海道農業研究センター保有）を鋳型として、ベクター部分を含み、Ａｒｃ５－１をコードする遺伝子の特定の可変領域のアミノ酸部位が末端となるようにしてＰＣＲにより得られたＤＮＡ断片と、上記で合成した（Ａβ４－１０）×２をコードする二本鎖ＤＮＡ断片とを連結して改変型Ａｒｃ５－１をコードする遺伝子を含むプラスミドを作製した。

具体的な方法を以下に示す。

[0082] Ａｒｃ５－１をコードする遺伝子の可変領域Ａに挿入するための、配列番号３８及び３９のプライマーペアからなるプライマーセット（ＰＳ－Ａ）、可変領域Ｂに挿入するための、配列番号４０及び４１のプライマーペアからなるプライマーセット（ＰＳ－Ｂ）の２つのプライマーセットを調製した。ここで、合成に当たっては、改変型Ａｒｃ５－１タンパク質よりＡβ４－１０をプロテアーゼの一種であるサーモリシンにより切り出すことができるように、挿入領域前後のアミノ酸置換を導入するための塩基置換を導入した。

[0083] 上記各プライマーセットを用いて（Ａβ４－１０）×２をコードするＤＮＡが挿入される配列番号３６の領域を、それぞれＰＳ－Ａ領域及びＰＳ－Ｂ領域と呼ぶ。

[0084] ｐＢＳＫ－Ａｒｃ５－１の１０ｎｇを鋳型としてＰＣＲを行った。ＰＣＲは、一反応あたり５０μｌの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリング５７℃で３０秒及び伸長反応６８℃で４分を１サイクルとして２５サイクル行った。こうして得られたＤＮＡ断片と上記の（Ａβ４－１０）×２をコードする二本鎖ＤＮＡ断片との連結反応を行った。

[0085] こうして、Ａｒｃ５－１をコードする遺伝子の可変領域に（Ａβ４－１０）×２をコードするＤＮＡを挿入した、改変型Ａｒｃ５－１をコードする遺伝子を含むプラスミドを２種類作製した。以下に具体的な（Ａβ４－１０）×２をコードするＤＮＡの挿入領域とそれらに対応する改変型Ａｒｃ５－１をコードする遺伝子の名称を表２に示す。

[0086] [表2]

表２

名称	（Aβ４－１０）×２をコードするＤＮＡの挿入部位および個数
Ａｒｃ５Ｍ１	ＰＳ－Ａ領域に１つ
Ａｒｃ５Ｍ２	ＰＳ－Ｂ領域に１つ

[0087] 改変型Ａｒｃ５－１を種子特異的に発現させるため、上記で得られたＡｒｃ５Ｍ１、Ａｒｃ５Ｍ２と、上記実施例１で得られたＡ１ａＢ１ｂ遺伝子のＧｙ１ＰおよびＧｙ１ＴをｐＵＨＧベクターに連結し、発現プラスミドの構築を行った。改変型Ａｒｃ５－１をコードするＤＮＡ断片を得るため、上記Ａｒｃ５Ｍ１およびＡｒｃ５Ｍ２を鋳型に、配列番号４２及び４３のプライマーペアからなるプライマーセットを用いてＰＣＲを行った。

[0088] ＰＣＲは、一反応あたり５０μｌの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを５７℃で３０秒及び伸長反応を６８℃で１分を１サイクルとして２５サイクル行った。こうして、改変型Ａｒｃ５－１遺伝子のＤＮＡ断片を得た。

[0089] 改変型Ａｒｃ５－１遺伝子のＤＮＡ断片、Ｇｙ１ＰおよびＧｙ１Ｔはリン酸化反応後、あらかじめＳｍａＩで切断後脱リン酸化反応を行ったｐＵＨＧベクターと連結反応を行った。

[0090] こうして、改変型Ａｒｃ５－１遺伝子が種子特異的に発現する植物形質転換ベクターｐＵＨＧ Ａｒｃ５Ｍ１およびｐＵＨＧ Ａｒｃ５Ｍ２を構築した。

[0091] [実施例３]

<u>改変型イネのプロラミンの発現プラスミドの構築</u>

（Ａβ４－１０）×２をコードするＤＮＡを挿入してなる改変型プロラミンをコードする遺伝子をダイズ種子中で発現させるための発現プラスミドを構築した。

[0092] 公知のイネのプロラミン１０KのＲＰ１０をコードする遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｅ０９７８２）（配列番号４４）の可変

領域は明らかになっていないため、可変領域の推定を行った。ＲＰ１０のアミノ酸配列と、とうもろこしの主要貯蔵タンパク質の一つであるゼインデルタとアミノ酸配列の比較を行った。その結果、配列番号４５のアミノ酸番号１１０番目に当たるリジン後に、１１残基のギャップが認められた。従ってこの部位（アミノ酸番号１１０～１１１）をコードする配列番号４４の塩基配列領域を可変領域ａと推定した。

[0093] 次にイネのプロラミン１０KのＲＰ１０をコードするｃＤＮＡがｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）のＳｍａＩサイトにクローニングされている、プラスミドｐＢＳＫ－ＲＰ１０（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、北海道農業研究センター保有）を鋳型として、ベクター部分を含み、ＲＰ１０をコードする遺伝子の特定の可変領域ａのアミノ酸部位が末端となるようにしてＰＣＲにより得られたＤＮＡ断片と、実施例２で合成した（Ａβ４－１０）×２をコードする二本鎖ＤＮＡ断片を連結し、改変型ＲＰ１０をコードする遺伝子を含むプラスミドを作製した。

具体的な方法を以下に示す。

[0094] ＲＰ１０をコードする遺伝子の可変領域ａに挿入するための、配列番号４６及び４７のプライマーペアからなるプライマーセットを調製した。また、合成に当たっては、改変型ＲＰ１０タンパク質よりＡβ４－１０ペプチドをプロテアーゼの一種であるサーモリシンにより切り出すことができるように、挿入領域前後のアミノ酸置換を導入するための塩基置換も同時に導入した。

[0095] ｐＢＳＫ－ＲＰ１０の１０ｎｇを鋳型としてＰＣＲ反応を行った。ＰＣＲは、一反応あたり５０μｌの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを５７℃で３０秒及び伸長反応を６８℃で４分を１サイクルとして２５サイクル行った。こうして得られた各ＤＮＡ断片と上記の（Aβ４－１０）×２をコードする二本鎖ＤＮＡ断片との連結反応を行った。

[0096] こうして、ＲＰ１０をコードする遺伝子の可変領域に（Aβ４－１０）×２をコードするＤＮＡを挿入した改変型ＲＰ１０をコードする遺伝子を含むプラスミド（ＲＰ１０Ｍ１）を作製した。

[0097] 改変型ＲＰ１０をコードする遺伝子を種子特異的に発現させるため、改変型ＲＰ１０をコードする遺伝子と、上記実施例１で得られたＧｙ１ＰおよびＧｙ１ＴをｐＵＨＧベクターに連結した発現プラスミドの構築を行った。改変型ＲＰ１０をコードするＤＮＡ断片を得るため上記ＲＰ１０Ｍ１を鋳型に、配列番号４８及び４９からなるプライマーセットを用いてＰＣＲを行った。

[0098] ＰＣＲは、一反応あたり５０μｌの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを５７℃で３０秒及び伸長反応を６８℃で１分を１サイクルとして２５サイクル行った。こうして、改変型ＲＰ１０をコードするＤＮＡ断片を得た。

[0099] 改変型ＲＰ１０をコードするＤＮＡ断片、プロモーターＤＮＡ断片、ターミネーターＤＮＡ断片はリン酸化反応後、あらかじめＳｍａＩで切断後脱リン酸化反応を行ったｐＵＨＧベクターと連結反応を行った。

[0100] こうして、改変型ＲＰ１０をコードする遺伝子が種子特異的に発現する植物形質転換ベクターｐＵＨＧ　ＲＰ１０Ｍ１を構築した。

[0101] ［実施例４］

<u>アルセリン２プロモーターによる各種改変型発現プラスミドの構築</u>

実施例１で作成した改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子をインゲンマメ由来のアルセリン２プロモーターによりダイズ種子中で発現させるための発現プラスミドを構築した。

（１）インゲンマメ由来アルセリン２プロモーターの単離

インゲンマメ野生種（系統番号：Ｇ１２８６６）の生葉１ｇからＤＮｅａｓｙ　Ｐｌａｎｔ　Ｍａｘｉ　ｋｉｔ（キアゲン社製）を用いてゲノミックＤＮＡ５０μｇを抽出した。

２８０ｎｇの上記ゲノミックＤＮＡを制限酵素ＳａｕＩＩＩＡＩで消化した後

、ｄＧＴＰを加え、ｋｌｅｎｏｗ　ｅｎｚｙｍｅ（プロメガ社製）により１塩基伸長反応を行った（第１回伸長反応）。その後、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のRWA－１アダプターとＬｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）を用いて連結反応を行い、アルセリン２遺伝子の上流域のＤＮＡを単離するためのＰＣＲの鋳型とした。

次に、公知のインゲンマメアルセリン２遺伝子のｃＤＮＡの塩基配列（Gen Bank accession No.M28470）に基づき、配列番号５０及び配列番号５１の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（それぞれプライマーＳＰ１及びプライマーＳＰ２と命名）を、株式会社ファスマックのカスタム合成受託サービスを利用して作製した。

配列番号５０（プライマーＳＰ１）　TTGGTTTTGT TGAACGTCTC GAC

配列番号５１（プライマーＳＰ２）　GGTGAGAAGC ACAAGGAAGA GG

[0102] 次に、上記で構築したアダプターを連結したゲノミックＤＮＡ２．８ｎｇを鋳型とし、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のプライマーWP－１及びプライマーＳＰ１を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲは、一反応あたり５０μＬの反応液を用い、変性反応を９４℃、２分で１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを６５℃で３０秒、及び伸長反応を６８℃で５分を１サイクルとして３５サイクル行った。なお、反応液は２００μＭのｄＮＴＰ混合液、１．５ｍＭの$MgSO_4$溶液、１μＭの上記各プライマー、１ユニットのＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（東洋紡績社製）を含むＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ．２バッファーを含んでいる。

ＰＣＲ終了後、反応液を１００倍に希釈し、その１μＬを２回目のＰＣＲの鋳型とし、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のプライマーWP－２及びプライマーＳＰ２を用いてＰＣＲを行った。なお、２回目のＰＣＲの溶液組成及び温度条件は、鋳型とプライマー以外、１回目のＰＣＲと同条件で行った。

増幅されたＤＮＡ断片は、最終濃度１ｍＭのＡＴＰ存在下でＴ４　Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｋｉｎａｓｅ（タカラバイオ社製）でリン酸化反

応を行った後、予めＳｍａＩで処理したｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）と連結反応を行った。

この反応産物を、Ａｒｃ２Ｐ（ｉ）とし、株式会社ファスマックのＤＮＡシーケンシングサービスを用いて塩基配列を決定した。その結果、アルセリン２遺伝子の開始コドンの上流８４４ｂｐの新規な領域を含むことを確認した。

[0103] 次に、さらに上流域を単離するため、新たなプライマーを作製し第二回目となる伸長反応を行った。

２８０ｎｇの上記ゲノミックＤＮＡを制限酵素ＢｇｌＩＩで消化した後、ｄＧＴＰを加え、ｋｌｅｎｏｗ　ｅｎｚｙｍｅ（プロメガ社製）により１塩基伸長反応を行った。反応後、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のＲＷＡ－１アダプターと連結反応を行い、プロモーター単離のためのＰＣＲの鋳型とした。

次に、公知のインゲンマメアルセリン２遺伝子のｃＤＮＡの塩基配列（Gen Bank accession No.M28470）に基づき、配列番号５２の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（プライマーｓｅｃｏｎｄＳＰ１と命名）を、また第一回伸長反応で得られた開始コドンの上流８４４ｂｐの塩基配列に基づき配列番号５３の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（プライマーｓｅｃｏｎｄＳＰ２と命名）を作製した。

配列番号５２（プライマーｓｅｃｏｎｄＳＰ１）　CAGATTTTTT　GCCCTCAAA A　TTGATG

配列番号５３（プライマーｓｅｃｏｎｄＳＰ２）　CGGATGTGCG TGGACTACAA GG

[0104] 次に、上記で構築したアダプターを連結したゲノミックＤＮＡ２．８ｎｇを鋳型とし、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のプライマーＷＰ－１及びプライマーｓｅｃｏｎｄＳＰ１を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲの溶液組成及び温度条件は、鋳型とプライマー以外、上記の第一回伸長反応と同条件で行った。

反応終了後、上記ＰＣＲ液を１００倍に希釈し、その１μＬを２回目のＰＣＲの鋳型とし、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のプライマーＷＰ－２及びプライマーｓｅｃｏｎｄＳＰ２を用いてＰＣＲを行った。なお、２回目のＰＣＲの溶液組成及び温度条件は、鋳型とプライマー以外、１回目のＰＣＲと同条件である。

増幅されたＤＮＡ断片は、最終濃度１ｍＭのＡＴＰ存在下でＴ４　Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｋｉｎａｓｅ（タカラバイオ社製）でリン酸化反応を行った後、予めＳｍａｌで処理したｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）と連結反応を行った。

反応産物を、Ａｒｃ２Ｐ（ii）とし塩基配列を決定した。次に、さらに上流域を単離するため、新たなプライマーを作製し第三回目となる伸長反応を行った。

２８０ｎｇの上記ゲノミックＤＮＡを制限酵素Ｘｂａｌで消化した後、ｄＣＴＰを加え、ｋｌｅｎｏｗ　ｅｎｚｙｍｅ（プロメガ社製）により１塩基伸長反応を行った。反応後、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のＲＷＡ－２アダプターと連結反応を行い、プロモーター単離のためのＰＣＲの鋳型とした。

次に、第二回伸長反応で得られた１９７ｂｐの塩基配列に基づき、配列番号５４及び配列番号５５の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（それぞれプライマーｔｈｉｒｄＳＰ１及びプライマーｔｈｉｒｄＳＰ２と命名）を作製した。

配列番号５４（プライマーｔｈｉｒｄＳＰ１）　CGACCTGAAG AACGCAGC GG CGACC

配列番号５５（プライマーｔｈｉｒｄＳＰ２）　TACCAGCAGT TGATGGAC AA GATC

[0105] 次に、上記で構築したアダプターを連結したゲノミックＤＮＡ２．８ｎｇを鋳型とし、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のプライマーＷＰ－１及びプライマーｔｈｉｒｄＳＰ１を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲの溶液組成及び

温度条件は、鋳型とプライマー以外、上記の第一回伸長反応と同条件で行った。

反応終了後、上記反応液を１００倍に希釈し、その１μＬを２回目のＰＣＲの鋳型とし、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のプライマーWP－２及びプライマーｔｈｉｒｄＳＰ２を用いてＰＣＲを行った。なお、２回目のＰＣＲの溶液組成及び温度条件は、鋳型とプライマー以外、１回目のＰＣＲと同条件である。

増幅されたＤＮＡ断片は、最終濃度１mMのＡＴＰ存在下でＴ４　Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｋｉｎａｓｅ（タカラバイオ社製）でリン酸化反応を行った後、予めＳｍａｌで処理したｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔII　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）と連結反応を行った。

この反応産物を、Ａｒｃ２Ｐ（iii）とし、塩基配列を決定した。その結果、Ａｒｃ２Ｐ（ii）の上流２８１９ｂｐ（合計３８６０ｂｐ）の新規な領域を含むことを確認した。以上、三回の伸長反応によってアルセリン２遺伝子の開始コドンの上流５′側非翻訳領域を含む３８６０ｂｐの新規なプロモーター配列を含むＤＮＡ（Ａｒｃ２Ｐ）を取得した（配列番号５６：このうちプロモーター領域は塩基番号１３９９～３８６０）。

[0106] （２）インゲンマメ由来アルセリン２ターミネーターの単離

上記（１）で抽出したゲノミックＤＮＡ２８０ｎｇを制限酵素Ｎｈｅｌで消化した後、ｄＣＴＰを加え、ｋｌｅｎｏｗ　ｅｎｚｙｍｅ（プロメガ社製）により１塩基伸長反応を行った。反応後、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のRWA－２アダプターとＬｉｇａｔｉｏｎ　ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）を用いて連結反応を行い、ターミネーター遺伝子の単離のためのＰＣＲの鋳型とした。

次に、公知のインゲンマメアルセリン２遺伝子のｃＤＮＡの塩基配列（Gen Bank accession No.M28470）に基づき、配列番号５７及び配列番号５８の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド（それぞれプライマーＳＰ３及びプライマーＳＰ４と命名）を作製した。

配列番号５７（プライマーＳＰ３）CATCAATTTT GAGGGCAAAA AATCTG

配列番号５８（プライマーＳＰ４）CGTTCCAACA TCCTCCTCAA CAAGATC

[0107] 次に、上記で構築したアダプターを連結したゲノミックＤＮＡ２．８ｎｇを鋳型とし、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のプライマーWＰ－１及プライマーＳＰ３を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲは、一反応あたり５０μＬの反応液を用い、変性反応を９４℃で２分、１サイクル実施後、変性反応を９４℃で３０秒、アニーリングを６５℃で３０秒、及び伸長反応を６８℃で５分を１サイクルとして３５サイクル行った。なお、反応液は２００μMのｄＮＴＰ混合液、１．５mMの$MgSO_4$溶液、１μMの上記各プライマー、１ユニットのＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（東洋紡績社製）を含むＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ．２バッファーを含んでいる。

ＰＣＲ終了後、反応液を１００倍に希釈し、その1μＬを２回目のＰＣＲの鋳型とし、ＲｉｇｈｔＷａｌｋ　Ｋｉｔ™付属のプライマーWＰ－２及びプライマーＳＰ４を用いてＰＣＲを行った。なお、２回目のＰＣＲの溶液組成及び温度条件は、鋳型とプライマー以外、１回目のＰＣＲと同条件で行った。

増幅されたＤＮＡ断片は、最終濃度１mMのＡＴＰ存在下でＴ４　Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｋｉｎａｓｅ（タカラバイオ社製）でリン酸化反応を行った後、予めＳｍａＩで処理したｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）と連結反応を行った。

反応産物を、Ａｒｃ２Ｔとし、塩基配列を決定した。その結果、アルセリン２遺伝子の３’側非翻訳領域を含む終止コドンの下流７９５ｂｐの新規な領域を含むことを確認した（配列番号５９）。

[0108] （３）各種改変型発現プラスミドの構築

改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子を種子で発現させるため、実施例１で得られた各種改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子、Ａｒｃ２ＰおよびＡｒｃ２Ｔを公知のｐＵＨＧベクター（前述）図３）に連結し、発現プラ

スミドの構築を行った。

改変型Ａ１ａＢ１ｂ遺伝子のＤＮＡ断片、プロモーターＤＮＡ断片、ターミネーターＤＮＡ断片はリン酸化反応後、あらかじめＳｍａＩで切断後ＣＩＡＰ（タカラバイオ社製）で脱リン酸化反応を行ったｐＵＨＧベクターと連結反応を行った。得られたクローンからＡｒｃ２Ｐプロモーター、改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子、Ａｒｃ２Ｔターミネーターの順に正しく連結されたクローンを、塩基配列を解析することによって選択した。

こうして、改変型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子がアルセリン２プロモーターの制御下で種子特異的に発現する以下の植物形質転換ベクター５種（ｐＵＨＧＡ２ＰＡ１ａＢ１ｂＭ１、ｐＵＨＧＡ２ＰＡ１ａＢ１ｂＭ３、ｐＵＨＧＡ２ＰＡ１ａＢ１ｂＭ５）を構築した。

また、同様にして前述のＲＰ１０Ｍ１をコードする遺伝子が種子特異的に発現する植物形質転換ベクターｐＵＨＧＡ２ＰＲＰ１０Ｍ１を構築した。

[0109] ［実施例５］

改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子のダイズへの導入

公知の方法（K. Nishizawa, Y. Kita, M. Kitayama, M. Ishimoto. （２００６） A red fluorescent protein, DsRed2, as a visual reporter for transient expression and stable transformation in soybean. Plant Cell Reports ２５：１３５５－１３６１）により、ダイズ品種Ｊａｃｋおよび主要な種子貯蔵タンパク質である１１Ｓグロブリン及び７Ｓグロブリンを欠損する変異系統（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構、北海道農業研究センター保有）（Y. Kita, K. Nishizawa, M Takahashi, M. Kitayama, M. Ishimoto. （２００７）Genetic improvement of somatic embryogenesis and regeneration in so

ｙｂｅａｎ ａｎｄ ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｂｒｅｅｄｉｎｇ ｌｉｎｅｓ．Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ２６：４３９－４４７）の未熟種子から誘導された不定胚塊（直径３ｍｍ以下）３０個を１．５ｍｌ用のチューブに加え、ウイスカー超音波法（特許第３３１２８６７号）により遺伝子導入操作を行った。

[0110] チタン酸カリウム製ウイスカーＬＳ２０（チタン工業社製）５ｍｇを１．５ｍｌ容のチューブに入れ、１時間放置した後、エタノールを除去し、完全に蒸発させて、殺菌されたウイスカーを得た。このウイスカーの入ったチューブに滅菌水１ｍｌを入れ、良く攪拌した。ウイスカーと滅菌水を遠心分離し、上清の水を捨てた。このようにしてウイスカーを洗浄した。このウイスカー洗浄操作を３回行った。その後、同チューブに公知のＭＳ液体培地の０．５ｍｌを加えてウイスカー懸濁液を得た。

[0111] 上記で得られたウイスカー懸濁液の入ったチューブに、上記の不定胚塊（直径３ｍｍ以下）３０個を入れて攪拌した後、混合物を１０００ｒｐｍで１０秒間遠心分離し、不定胚塊とウイスカーを沈殿させ、上清を捨て、不定胚塊とウイスカーの混合物を得た。

[0112] この混合物を入れたチューブに、実施例１～４で作製した改変型種子貯蔵タンパク質発現ベクターの各２０μｌ（２０μｇ）を加え、十分振り混ぜて均一な混合物を得た。

[0113] 次にこの均一な混合物の入ったチューブを１８０００ｘｇで５分間遠心分離した。遠心分離した混合物を再度振り混ぜ、この操作を３回反復した。

[0114] 上記のようにして得られた、不定胚塊と、ウイスカーと、ベクターを収容しているチューブを超音波発生機の浴槽にチューブが十分浸るように設置した。周波数４０ｋＨｚの超音波を強度０．２５Ｗ／ｃｍ^{2}で１分間照射した。照射後、１０分間、４℃でこの混合物を保持した。このように超音波処理した混合物を前記のＭＳ液体培地で洗浄した。

[0115] 処理後の不定胚塊を公知の不定胚増殖液体培地で1週間回転振とう培養し（１００ｒｐｍ）、その後にハイグロマイシンB（１５ｍｇ／ｌ）（ロッシュ・

ダイアグノスティックス、マンハイム、ドイツ）を含んでいる新鮮な不定胚増殖液体培地で１週間培養した。さらに３０ｍｇ／ｌのハイグロマイシンBを含んでいる不定胚増殖液体培地で４週間培養（毎週培地を交換する）した後、４５ｍｇ／ｌのハイグロマイシンBを含んだ不定胚増殖液体培地で1週間選抜培養を行った。なお、遺伝子導入は各ベクターごとにマイクロチューブ１２本の処理を行った。

[0116] ハイグロマイシン耐性の不定胚塊を公知の不定胚成熟液体培地へ移し、４週間振とう培養（１００ｒｐｍ）を継続し不定胚を成熟させた。成熟した不定胚を滅菌シャーレ中に３から５日間置き乾燥させた後、公知の発芽固体培地に移した。７から１０日間発芽培養を行った後、公知の発根培地に移し、発芽している幼植物体を成長させた。根と芽が伸びた後に、土壌を含んでいるポットへ植物を移し、順化するまで高湿度に維持した。

[0117] ［実施例６］

改変型種子貯蔵タンパク質遺伝子を導入した形質転換ダイズ植物の作出

このようにしてＪａｃｋ品種にA1ａB1BＭ１を導入した形質転換ダイズ植物を６個体、A1ａB1ｂＭ２を導入した形質転換体を６個体、Ａ１ａＢ１ｂＭ３を導入した形質転換体を５個体、Ａ１ａＢ１ｂＭ４－１を導入した形質転換体を５個体、Ａ１ａＢ１ｂＭ５を導入した形質転換体を９個体作出した。さらに、Ａｒｃ５Ｍ１を導入した形質転換ダイズ植物を３個体、Ａｒｃ５Ｍ２を導入した形質転換体を３個体、ＲＰ１０Ｍ１を導入した形質転換ダイズ植物を２個体作出した。

また、前記１１Ｓグロブリン及び７Ｓグロブリンを欠損する変異系統（以下、種子貯蔵タンパク質欠損品種という）にＡ１ａＢ１ｂＭ１を導入した形質転換ダイズ植物を１２個体、ＲＰ１０Ｍ１を導入した形質転換ダイズ植物を６個体作出した。

さらに種子貯蔵タンパク質欠損品種にＡ１ａＢ１ｂＭ３を導入した形質転換ダイズ植物を５個体、作出した。

さらに、種子貯蔵タンパク質欠損品種にＡ２ＰＡ１ａＢ１ｂＭ１を導入し

た形質転換体を８個体、Ａ２ＰＡ１ａＢ１ｂＭ３を導入した形質転換体を３３個体、Ａ２ＰＡ１ａＢ１ｂＭ５を導入した形質転換体を３２個体、Ａ２ＰＲＰ１０Ｍ１を導入した形質転換体を９個体作出した。

これらの形質転換ダイズの植物体は環境湿度に適応させた後、１００００ｌｘ、１６時間日長の環境下で栽培を継続し、すべての個体から種子を収穫した。こうして、形質転換ダイズ植物のT_1世代の種子を得た。

[0118] ［実施例７］

形質転換ダイズ種子におけるＡβ４－１０の蓄積量の評価

上記実施例６で得た形質転換ダイズ種子より全タンパク質を抽出し、Ａβ４－１０の蓄積量をＡβ４－１０に対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティング法で評価した。特に蓄積量の高い系統については、定量解析を行った。

[0119] １）改変型Ａ１ａＢ１ｂとして発現されたＡβ４－１０の蓄積量

形質転換ダイズ種子より抽出した全タンパク質20μｇをＳＤＳ-ＰＡＧＥで分離し、Ａβ４－１０に対する特異抗体を反応させた後、ＥＣＬ Ａｄｖａｎｃｅ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス株式会社製）を用いて検出を行った。化学発光像を、ＬＡＳ４０００ｍｉｎｉＰＲ（富士フィルム社製）で取り込んだ後、同機付属の解析ソフトウェアＭｕｌｔｉＧａｇｅを用いて定量解析を行った。定量の標品としては、大腸菌発現系で作製したＨｉｓ・Ｔａｇ連結組換えタンパク質Ａ１ａＢ１ｂＭ１を用いた。

[0120] その結果、上記実施例６で得た形質転換ダイズ種子の各系統にＡβ４－１０に相当するシグナルバンドが確認でき、Ａβ４－１０の蓄積が確認できた。そのうち蓄積量の高かったＡ１ａＢ１ｂＭ１、Ａ１ａＢ１ｂＭ３、Ａ１ａＢ１ｂＭ５をＪａｃｋ品種に導入した形質転換ダイズ種子（系統No. １０－２、No. ａ－２、No. ６－６）とＡ１ａＢ１ｂＭ１を種子貯蔵タンパク質欠質品種に導入した形質転換ダイズ種子（系統No. １６－２）中の蓄積量の測定を行い表３に示した。

[0121] [表3]

表３

改変型遺伝子	品種	系統 No.	Ａβ４－１０蓄積量（μｇ／１ｇ種子重）
Ａ１ａＢ１ｂＭ１	Ｊａｃｋ	１０－２	３５
Ａ１ａＢ１ｂＭ１	欠損品種	１６－２	８７０
Ａ１ａＢ１ｂＭ３	Ｊａｃｋ	ａ－２	４２
Ａ１ａＢ１ｂＭ５	Ｊａｃｋ	６－６	１０８

[0122] また、Ａ１ａＢ１ＢＭ１（Ａβ４－１０が３個挿入されている遺伝子）をＪａｃｋ品種および種子貯蔵タンパク質欠損品種に導入した形質転換ダイズにおける改変型種子貯蔵タンパク質の蓄積量の比較をウエスタンブロット解析により行った結果を図４に示した（矢印は改変型種子貯蔵タンパク質に相当するバンド）。その結果、Ａ１ａＢ１Ｍ１をＪａｃｋ品種に導入した形質転換体１０－２系統（種子Ｎｏ．１～３）における改変型種子貯蔵タンパク質の蓄積量が種子中の全タンパク質の約０．１～０．２％であるのに比べ、種子貯蔵タンパク質欠損系統へ導入した形質転換体１６－２系統（種子No. １～３）における蓄積は種子中の全タンパク質の約１～２％と約１０倍高いことが確認できた。

さらに、Ａ１ａＢ１ＢＭ３（Ａβ４－１０が１個挿入されている遺伝子）を種子貯蔵タンパク質欠損品種に導入した形質転換ダイズにおける改変型種子貯蔵タンパク質の蓄積量の測定をウエスタンブロット解析により行った結果を表４に示した。

[0123] [表4]

表４

改変型遺伝子	品種	系統 No.	Ａβ４－１０蓄積量（μｇ／１ｇ種子重）
Ａ１ａＢ１ｂＭ３	欠損品種	５－２	１５６８
		５－６	２５０４
		７－３	２３４８

[0124] ２）改変型アルセリンとして発現されたＡβ４－１０の蓄積量

形質転換ダイズ種子より抽出した全タンパク質２０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、Ａβ４－１０に対する特異抗体で反応を行った後、ＥＣＬ Ａｄｖａｎｃｅ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス株式会社製）を用いてウエスタンブロット検出を行った結果、Ａｒｃ５Ｍ１を導入した形質転換ダイズ種子（系統２－１）およびＡｒｃ５Ｍ２導入した形質転換ダイズ種子（系統２－２）にＡβ４－１０ペプチドに相当するシグナルバンドが確認でき、Ａβ４－１０の蓄積が確認できた（図５）。

[0125] ３）改変型プロラミンとして発現されたＡβ４－１０の蓄積量

ＲＰ１０Ｍ１形質転換ダイズ種子（系統１－１、４－２）より抽出した全タンパク質２０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、Ａβ４－１０に対する特異抗体で反応を行った後、ＥＣＬ Ａｄｖａｎｃｅ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス株式会社製）を用いてウエスタンブロット検出を行った結果、ＰＲ１０Ｍ１を導入した形質転換ダイズ種子の各系統にＡβ４－１０ペプチドに相当するシグナルバンドが確認でき、Ａβ４－１０ペプチドの蓄積が確認できた（図６）。

同様に、種子貯蔵タンパク質欠損品種に導入したＲＰ１０Ｍ１形質転換ダイズ種子にＡβ４－１０ペプチドに相当するシグナルバンドが確認でき、Ａβ４－１０ペプチドの蓄積が確認できた。その際の蓄積量は、No.１－１系統で約３８０μｇ／ｇ種子であった。

[0126] ４）アルセリン２プロモーターによる改変型Ａ１ａＢ１ｂとして発現されたＡβ４－１０の蓄積量

形質転換ダイズ種子より抽出した全タンパク質２０μｇをＳＤＳ-ＰＡＧＥで分離し、実施例７の１）と同様の方法で検出を行った。

その結果、上記実施例６で得た形質転換ダイズ種子の各系統にＡβ４－１０に相当するシグナルバンドが確認でき、Ａβ４－１０の蓄積が確認できた（図７）。

また、シグナルバンドの強度から推定される種子貯蔵タンパク質欠損品種へ導入した形質転換ダイズ種子中のＡβ４－１０蓄積量は、当該Ａ２ＰＡ１ａＢ１ｂＭ１（系統４－６）は、Ａ１ａＢ１ｂＭ１（系統７－１）と比べてほぼ同等であって、Ｊａｃｋ品種に導入したＡ１ａＢ１ｂＭ１（系統８－１）と比べて明らかに蓄積量は多いことが確認できた（図７）。

[0127] ［実施例８］

改変型種子貯蔵タンパク質の効果検定

前記実施例１で作製したＡ１ａＢ１ｂＭ１を公知の方法により大腸菌に発現させて生産した。

[0128] Ａ１ａＢ１ｂＭ１にコードされる組換えタンパク質を得るために、Ａ１ａＢ１ｂＭ１をｐＥＴ２１－ｄベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に連結した、大腸菌発現プラスミドｐＥＴＡ１ａＢ１ｂＭ１を作製した。

[0129] 上記ｐＥＴＡ１ａＢ１ｂＭ１を定法により大腸菌ＡＤ４９４（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）に導入し、公知のＴＢ培地（カナマイシン最終１５ｍｇ／ｌとカルベネシリン最終５０ｍｇ／ｌを含む）５０ｍｌにおいて、上記の組換え大腸菌の培養を３７℃で１８時間行った後、その培養液の１０ｍｌを公知のＬＢ培地（カナマイシン最終１５ｍｇ／ｌとカルベネシリン最終５０ｍｇ／ｌおよび塩化ナトリウム最終５００ｍＭを含む）１０００ｍｌの生産培地に添加し３７℃で２時間培養を行った。その後、ＩＰＴＧを最終１ｍＭで添加し、２０℃で４８時間培養を行った。培養後、大腸菌の菌体を８０００ｒｐｍ、１５分の条件で回収した。回収後の菌体から、ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を用いて可溶性タンパク質画分の抽出を行った。得られた可溶性タンパク質画分からＮｉ－ＮＴＡ Ｈｉｓ・Ｂｉｎｄ Ｒｅｓｉｎｓ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）を用いて、Ａ１ａＢ１ｂＭ１がコードする組換えタンパク質（Ａ１ａＢ１ｂＭ１タンパク質）を精製した。

[0130] βアミロイド抗原決定基（Ａβ４－１０）を保有するＡ１ａＢ１ｂＭ１の５０μｇを生理食塩水に溶解して、生後４週齢のアルツハイマー病疾患モデ

ルマウス（ＴｇＣＲＮＤ８）に１週間間隔で５回、皮下注射（３匹／区）による投与を行った。改変されていない野生型Ａ１ａＢ１ｂをコードする遺伝子を上記と同様の方法で大腸菌に発現させ、得られた野生型Ａ１ａＢ１ｂを投与した群をコントロール群とした。投与９週後のマウスから血液を採取して、公知のＥＬＩＳＡによるサンドイッチ法によりＡβ４－１０に対する抗体産生を確認したところ、Ａ１ａＢ１ｂＭ１タンパク質投与区は、Ａ１ａＢ１ｂタンパク質投与区に比べて、明らかに抗体価の上昇が認められ、Ａ１ａＢ１ｂＭ１がコードする組換えタンパク質のワクチン効果が確認できた。

[0131] ［実施例９］ダイズ種子中の改変型種子貯蔵タンパク質の熱安定性

上記実施例６で得た形質転換ダイズ種子に対して各種熱処理を行い、種子中の改変型種子貯蔵タンパク質の熱安定性について試験を行った。

１）形質転換ダイズ種子の焙煎処理区

Ａ１ａＢ１ｂＭ３形質転換ダイズ種子を粉砕した後、粉砕物の10mgをオートクレーブ滅菌装置にて１００℃で１０分間の処理を行い、その後上記実施例７に記載の方法で全タンパク質を抽出し、種子中の存在するＡβ４－１０の蓄積量をＡβ４－１０に対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティング法で評価した。

２）形質転換ダイズ種子の水煮処理区

Ａ１ａＢ１ｂＭ３形質転換ダイズ種子を粉砕した後、粉砕物の10mgに対し30μｌの蒸留水を加えて攪拌した後、オートクレーブ滅菌装置にて１００℃で１０分間の処理を行い、その後上記実施例７に記載の方法で全タンパク質を抽出し、種子中の存在するＡβ４－１０の蓄積量をＡβ４－１０に対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティング法で評価した。

３）形質転換ダイズ種子からのタンパク質抽出液の加熱処理区

Ａ１ａＢ１ｂＭ３形質転換ダイズ種子を粉砕した後、実施例７に記載の方法で全タンパク質を抽出し、その後オートクレーブ滅菌装置にて１００℃で１０分間の処理を行った。その後上記種子中の存在するＡβ４－１０の蓄積量をＡβ４－１０に対する特異抗体を用いたウエスタンブロッティング法で

評価した。

その結果、焙煎処理区および水煮処理区においてＡβ４－１０に相当するシグナルバンドが確認でき、その量は熱無処理区と同等であり、種子中の改変型種子貯蔵タンパク質の熱安定性が確認できた（図８）。

[0132] ［実施例１０］βアミロイド抗原決定基の形態

Ａβ４－１０をコードするアミノ酸配列のペプチド（Ｐ１）、Ｐ１をタンデムに２つ連結したアミノ酸配列のペプチド（Ｐ２）、さらにＰ１をタンデムに３つ連結したアミノ酸配列のペプチド（Ｐ３）をペプチド受託合成サービスを利用して合成した。

Ｐ１　：FRHDSGY（配列番号３）

Ｐ２　：FRHDSGY FRHDSGY（配列番号６０）

Ｐ３　：FRHDSGY FRHDSGY FRHDSGY（配列番号６１）

次にペプチドＰ１、Ｐ２、Ｐ３のＮ末側にキャリアタンパクのkey-limpet-hemocyanin（ＫＬＨ、Mw.1000000）をシステイン（Ｃｙｓ）を架橋として結合させたＫＬＨ－Ｐ１、ＫＬＨ－Ｐ２、ＫＬＨ－Ｐ３を作製した。

これらＫＬＨ－Ｐ１、ＫＬＨ－Ｐ２、ＫＬＨ－Ｐ３の５０μｇを生理食塩水に溶解して、生後４週齢のマウス（ＢＡＬＢｃ）に１週間間隔で５回、皮下注射（３匹／区）による投与を行った。投与９週後のマウスから血液を採取して、抗血清を採取した。得られた抗血清をアフィニティー精製して、KLH-P1、KLH-P2、KLH-P3に対する精製抗体を作製した。

市販の合成Ａβ４２の４００、１０００ピコモルをＳＤＳ-ＰＡＧＥで泳動し、上記のＫＬＨ－Ｐ１、ＫＬＨ－Ｐ２、ＫＬＨ－Ｐ３に対する上記の精製抗体を反応させた後、ＥＣＬ　Ａｄｖａｎｃｅ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス株式会社製）を用いて検出を行った。化学発光像を、ＬＡＳ４０００ｍｉｎｉＰＲ（富士フィルム社製）で取り込んだ後、Aβ４２との結合性についてシグナル強度の比較を行った。その結果、ＫＬＨ－Ｐ２のシグナル強度がＫＬＨ－Ｐ１、ＫＬＨ－Ｐ３よりも明らかに強く、Ａβ４－１０をコードするア

ミノ酸配列のペプチドをタンデムに２つ連結することによりＡβに対する抗体価の高い特異的抗体が得られることがわかった。（図９）

産業上の利用可能性

[0133] 本発明により、アルツハイマー病ワクチンをダイズの１１Sグロブリンや７Sグロブリン、インゲンマメのアルセリン、イネのプロラミンなどの種子貯蔵タンパク質との融合タンパク質として、ダイズの種子中で生産・蓄積させることが可能になるので、アルツハイマー病の予防、治療のために、アルツハイマー病ワクチンを大量に生産し、供給することが可能となる。

請求の範囲

[請求項1] 改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子が導入された形質転換ダイズ植物であって、該改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子は、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子がフレームシフトを生じないように挿入されたものであり、該改変型種子貯蔵タンパク質は種子中で発現して蓄積することを特徴とする、形質転換ダイズ植物。

[請求項2] 前記アルツハイマー病ワクチンが、βアミロイド抗原決定基であることを特徴とする、請求項１に記載の形質転換ダイズ植物。

[請求項3] βアミロイド抗原決定基が配列番号３のペプチドが１～３個連結された配列からなる、請求項２に記載の形質転換ダイズ植物。

[請求項4] 前記形質転換ダイズ植物は、内在性のダイズ１１Sグロブリン及び／又はダイズ７Sグロブリンを欠損していることを特徴とする請求項１～３のいずれか一項に記載の形質転換ダイズ植物。

[請求項5] 前記野生型種子貯蔵タンパク質が、ダイズ１１SグロブリンのＡ１ａＢ１ｂサブユニット、インゲンマメのアルセリン又はイネのプロラミンであることを特徴とする、請求項１～４のいずれか一項に記載の形質転換ダイズ植物。

[請求項6] 前記野生型種子貯蔵タンパク質が、配列番号２のアミノ酸配列、又は配列番号２のアミノ酸配列と９０%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むものであり、前記アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された可変領域が、配列番号２におけるアミノ酸番号１１１～１２８、アミノ酸番号１９８～２１６、アミノ酸番号２６８～３１５、及びアミノ酸番号４９０～４９５に相当するアミノ酸配列の群から選択される１つ又は複数のアミノ酸配列をコードする領域である、請求項５に記載の形質転換ダイズ植物。

[請求項7] 前記野生型種子貯蔵タンパク質が、配列番号３７のアミノ酸配列、又は配列番号３７のアミノ酸配列と９０%以上の同一性を有するアミノ

酸配列を含むものであり、前記アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された可変領域が、配列番号３７におけるアミノ酸番号１４９～１５０及び／またはアミノ酸番号２５０～２５１に相当するアミノ酸配列をコードする領域である、請求項５に記載の形質転換ダイズ植物。

[請求項8] 前記野生型種子貯蔵タンパク質が、配列番号４５のアミノ酸配列、又は配列番号４５のアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むものであり、前記アルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子が挿入された可変領域が、配列番号４５におけるアミノ酸番号１１０～１１１に相当するアミノ酸配列をコードする領域である、請求項５に記載の形質転換ダイズ植物。

[請求項9] 前記改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子はインゲンマメアルセリン２のプロモーターまたはダイズの１１ＳグロブリンＡ１ａＢ１ｂサブユニットのプロモーターによって発現制御された、請求項１～８のいずれか一項に記載の形質転換ダイズ植物。

[請求項10] 請求項１～９のいずれか一項に記載の形質転換ダイズ植物の細胞。

[請求項11] 請求項１～９のいずれか一項に記載の形質転換ダイズ植物の種子。

[請求項12] 請求項１１に記載の種子を加工してなる、ダイズ種子加工品。

[請求項13] 請求項１～９のいずれか一項に記載の形質転換ダイズ植物を用いて、該形質転換ダイズ植物の種子中でアルツハイマー病ワクチンを生産する方法。

[請求項14] ダイズ種子特異的な発現を誘導するプロモーターと、該プロモーターの下流に連結された、野生型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子の可変領域にアルツハイマー病ワクチンをコードする遺伝子がフレームシフトを生じないように挿入された改変型種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子とを含むベクター。

[請求項15] 前記プロモーターはインゲンマメアルセリン２のプロモーターまたはダイズの１１ＳグロブリンＡ１ａＢ１ｂサブユニットのプロモーター

である、請求項１４に記載ベクター。

[図1]

MAKLVFSLCFLLFSGCCFAFSSREQPQQNECQIQKLNALKPDNRIESEGGLIETWNPNNK

領域Ⅱ

PFQCAGVALSRCTLNRNALRRPSYTNGPQEIYIQQGKGIFGMIYPGCPSTFEEPQQPQQR

GQSSRPQDRHQKIYNFREGDLIAVPTGVAWWMYNNEDTPVVAVSIIDTNSLENQLDQMPR

領域Ⅲ

RFYLAGNQEQEFLKYQQEQGGHQSQKGKHQQEEENEGGSILSGFTLEFLEHAFSVDKQIA

領域Ⅳ

KNLQGENEGEDKGAIVTVKGGLSVIKPPTDEQQQRPQEEEEEEEDEKPQCKGKDKHCQRP

RGSQSKSRRNGIDETICTMRLRHNIGQTSSPDIYNPQAGSVTTATSLDFPALSWLRLSAE

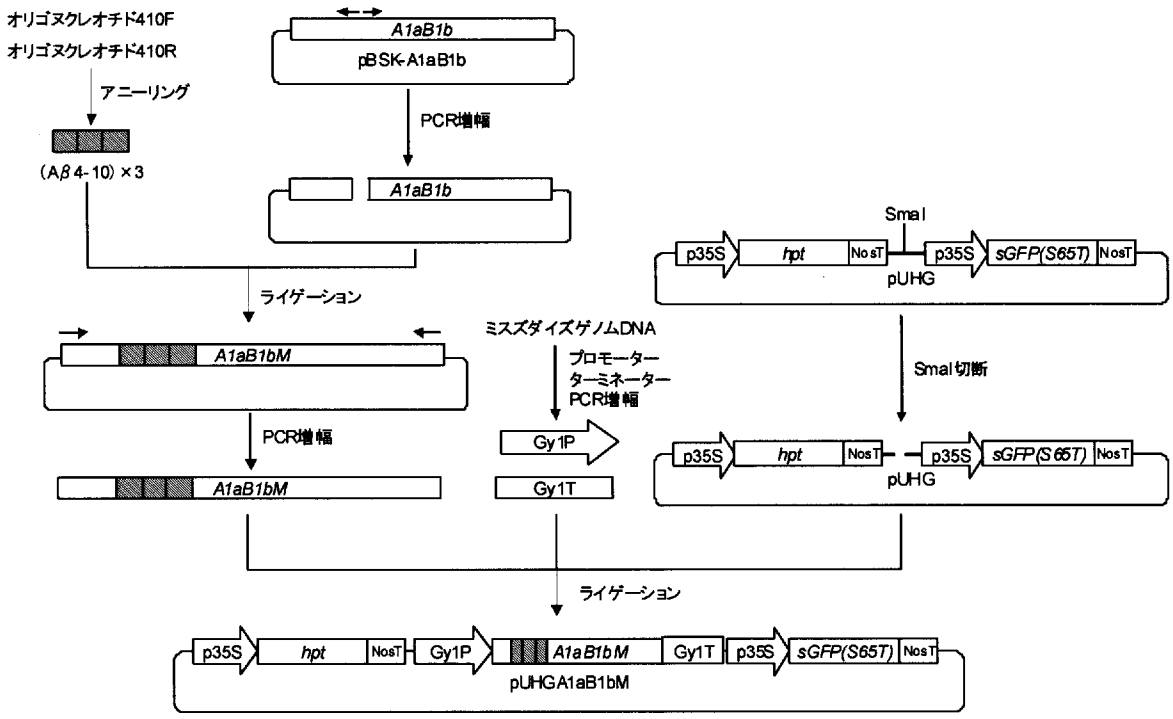
FGSLRKNAMFVPHYNLNANSIIYALNGRALIQVVNCNGERVFDGELQEGRVLIVPQNFVV

AARSQSDNFEYVSFKTNDTPMIGTLAGANSLLNALPEEVIQHTFNLKSQQARQIKNNNPF

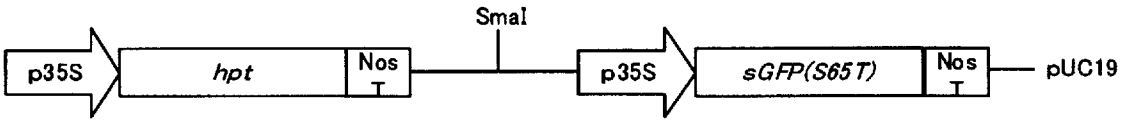
領域Ⅴ

KFLVPPQESQKRAVA 可変領域

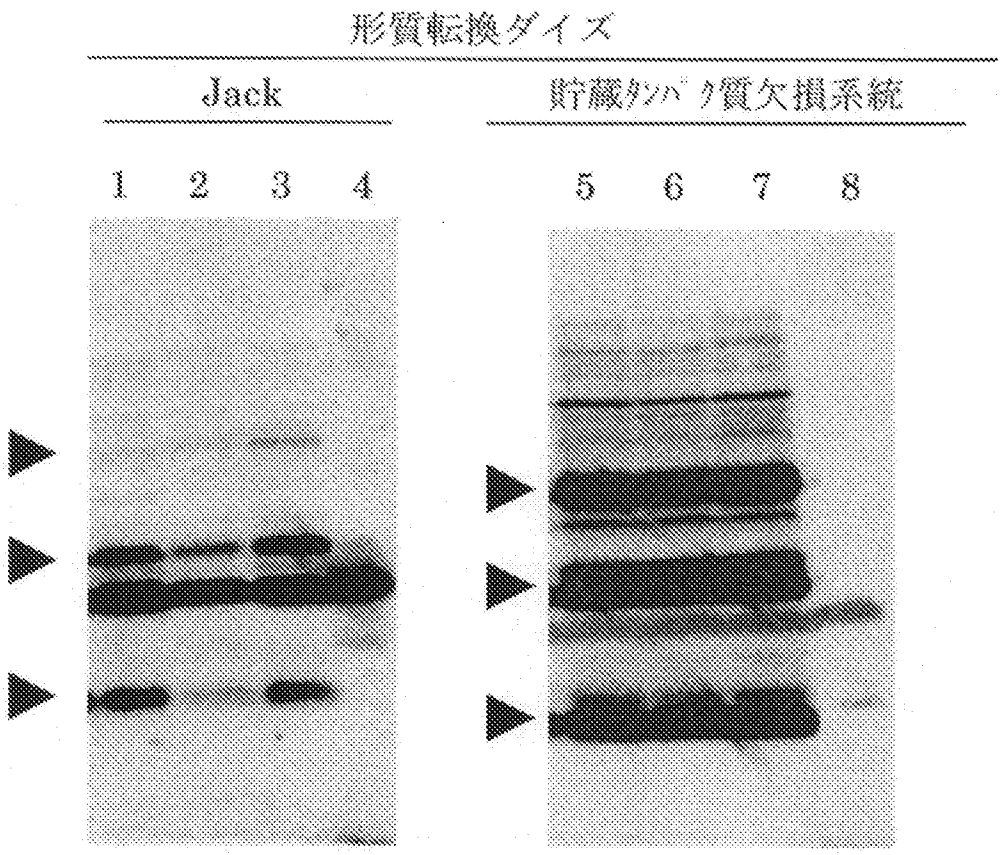
[図2]



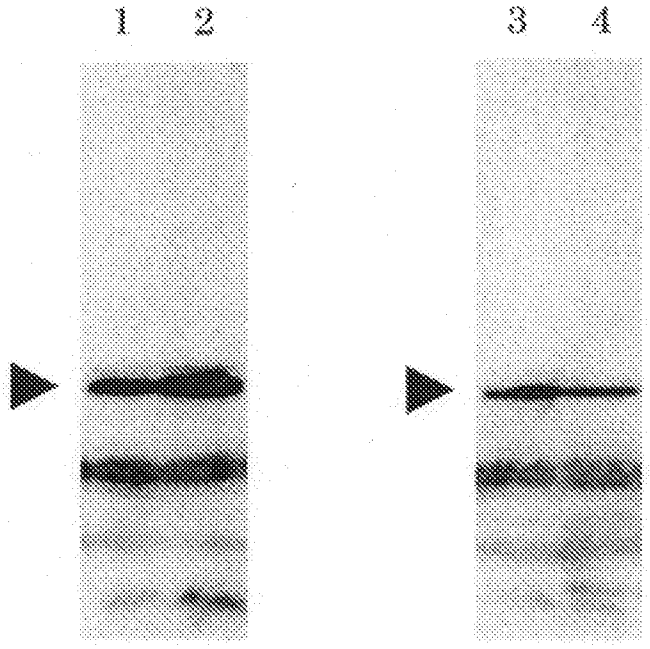
[図3]


SmaI
p35S
hpt
Nos
p35S
sGFP(S65T)
Nos
pUC19

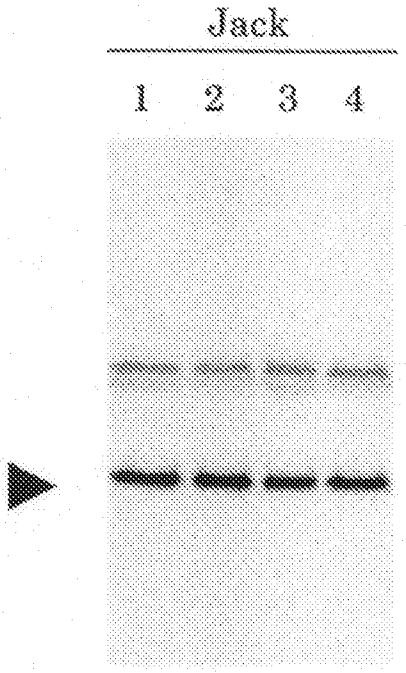
[図4]


形質転換ダイズ
Jack
貯蔵タンパク質欠損系統
1 2 3 4
5 6 7 8

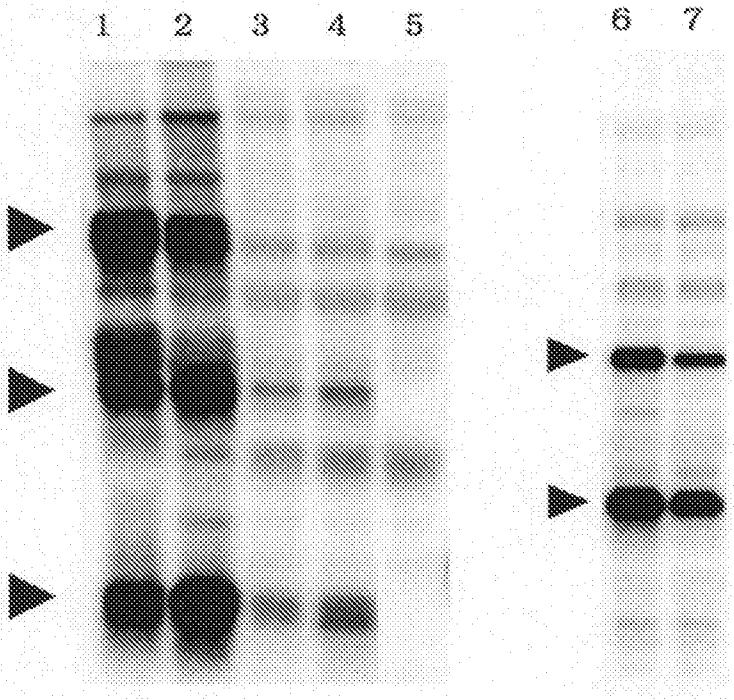
[図5]


1 2
3 4

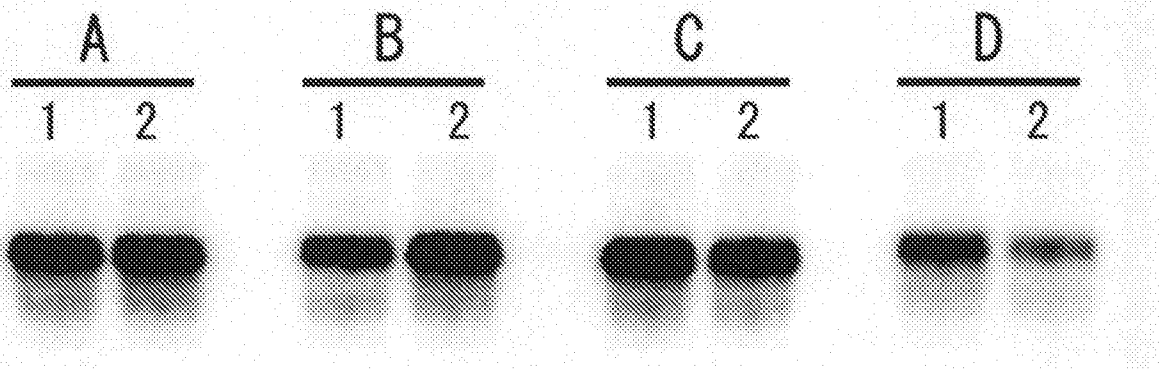
[図6]



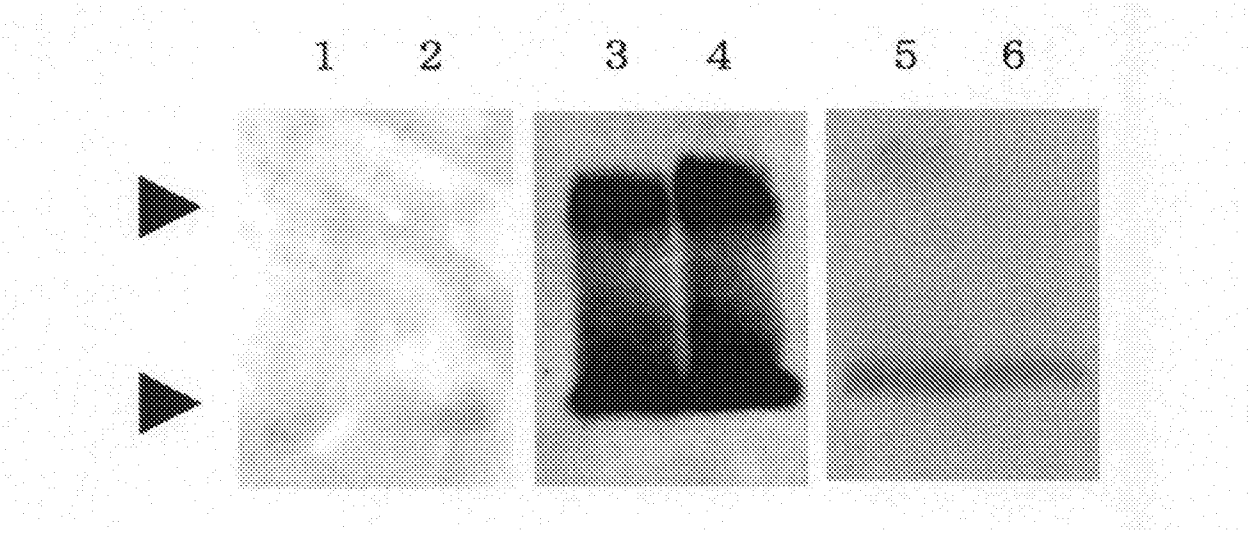
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/069977

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/00(2006.01)i, *A01H5/00*(2006.01)i, *A61K39/00*(2006.01)i, *A61P25/28*(2006.01)i, *C12N5/10*(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)
C12N15/00-15/90, A01H5/00, A61K39/00, A61P25/28, C12N1/00-7/08

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 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Hisakazu HASEGAWA, Teruhiko TERAKAWA, 'Ko Kinosei Busshitsu Seisan Daizu ni Kansuru Gijutsu Kaihatsu (sono 1) Kumikae Daizu ni yoru Kinosei Peptide Seisan Gijutsu no Kenkyu Kaihatsu', Preprints of Biotechnology Symposium, 06 November 2008 (06.11.2008), 28th, pages 87 to 88	1-5,7,9-15/ 6,8
Y	TAKAGI, H., et al., "A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses" Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2005, Vol.102, No.48, p.17525-17530	1-15

☒ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 January, 2010 (26.01.10)	09 February, 2010 (09.02.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/069977

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-321079 A (National Institute of Agrobiological Sciences), 18 November 2004 (18.11.2004), & US 2007/0136896 A1 & WO 2004/094637 A1 & CA 2523459 A	1-5,7,8, 10-15
Y	ADACHI, M., et al., "Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer" J.Mol. Biol., 2001, Vol.305, p.291-305	6-8
Y	Shigeru UTSUMI, 'Kinosei o Kyoka · Fuyo shita Daizu Tanpakushitsu o Bunshi Sekkei suru Tameno X-sen Kesho Kozo Kaiseki', Kinosei Shokuhin no Kaiseki to Bunshi Sekkei, Heisei 6 Nendo Dai 3 Kai Seika Hokokusho, 1995, pages 69 to 70	6
Y	MANEA, M., et al., "Polypeptide conjugates comprising a β-Amyloid plaque-specific epitope as new vaccine structures against Alzheimer's disease" Biopolymers, Vol.76, 2004, p.503-511	1-15
A	JP 2006-238821 A (National Agriculture and Food Research Organization), 14 September 2006 (14.09.2006), & WO 2006/093277 A1	1-15
A	UTSUMI, S., et al., "Synthesis, processing and accumulation of modified glycinins of soybean in the seeds, leaves and stems of transgenic tobacco" Plant Sci., 1993, Vol.92, p.191-202	1-15
A	Teruhiko TERAKAWA, Kazuhisa HASEGAWA, 'Ko Kinosei Busshitsu Seisan Daizu ni Kansuru Gijutsu Kaihatsu (sono 1) Kumikae Daizu ni yoru Kinosei Peptide Seisan Gijutsu no Kenkyu Kaihatsu', Preprints of Biotechnology Symposium, 06 November 2007 (06.11.2007), pages 103 to 104	1-15
A	JP 2000-50871 A (Director General of National Institute of Agrobiological Sciences), 22 February 2000 (22.02.2000), & US 6576820 B1 & WO 2000/008161 A1 & CA 2362013 A	1-15

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００９／０６９９７７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/00(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C12N5/10(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/00-15/90, A01H5/00, A61K39/00, A61P25/28, C12N1/00-7/08,

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	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	関連する請求項の番号
Ｙ／Ａ	長谷川久和　＆　寺川輝彦　「高機能性物質生産ダイズに関する技術開発（その１）組換えダイズによる機能性ペプチド生産技術の研究開発」バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 2008.11.06, 28th, p.87-88	1-5,7,9-15/6,8
Ｙ	TAKAGI, H., et al.,"A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses" Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2005, Vol.102, No.48, p.17525-17530	1-15

☑　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 ２６．０１．２０１０	国際調査報告の発送日 ０９．０２．２０１０
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 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）　４Ｂ　３５４１ 水落　登希子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	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	関連する請求項の番号
Y	JP 2004-321079 A (独立行政法人農業生物資源研究所) 2004.11.18, & US 2007/0136896 A1 & WO 2004/094637 A1 & CA 2523459 A	1-5,7,8,10-15
Y	ADACHI,M., et al.,"Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer" J.Mol.Biol., 2001, Vol.305, p.291-305	6-8
Y	内海成　「機能性を強化・付与した大豆タンパク質を分子設計するためのＸ線化粧構造解析」機能性食品の解析と分子設計、平成６年度第３回成果報告書, 1995, p.69-70	6
Y	MANEA,M., et al.,"Polypeptide conjugates comprising a β-Amyloid plaque-specific epitope as new vaccine structures against Alzheimer's disease" Biopolymers, Vol.76, 2004, p.503-511	1-15
A	JP 2006-238821 A (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 2006.09.14, & WO 2006/093277 A1	1-15
A	UTSUMI,S., et al.,"Synthesis, processing and accumulation of modified glycinins of soybean in the seeds, leaves and stems of transgenic tobacco" Plant Sci., 1993, Vol.92, p.191-202	1-15
A	寺川輝彦　＆　長谷川和久　「高機能性物質生産ダイズに関する技術開発（その１）組換えダイズによる機能性ペプチド生産技術の研究開発」バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 2007.11.06, p.103-104	1-15
A	JP 2000-50871 A (農林水産省農業生物資源研究所長) 2000.02.22, & US 6576820 B1 & WO 2000/008161 A1 & CA 2362013 A	1-15