

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-514432

(P2010-514432A)

(43) 公表日 平成22年5月6日(2010.5.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B 0 3 0
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 C	4 B 0 6 5
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-543473 (P2009-543473)
 (86) (22) 出願日 平成19年12月27日 (2007.12.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年8月21日 (2009.8.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/064590
 (87) 国際公開番号 W02008/080954
 (87) 国際公開日 平成20年7月10日 (2008.7.10)
 (31) 優先権主張番号 UD2006A000280
 (32) 優先日 平成18年12月29日 (2006.12.29)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

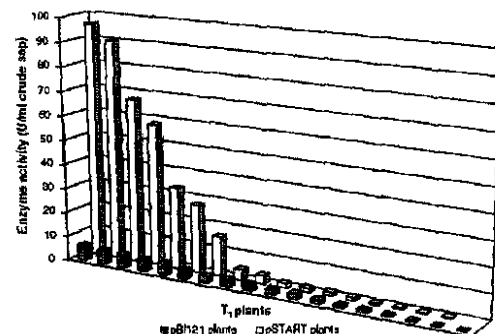
(71) 出願人 509177407
 ユニヴェルシタ・デッリ・ストゥーディ
 ・ディ・ウーディネ
 イタリア国イー33100・ウーディネ,
 ヴィア・パッラーディオ, 8
 (74) 代理人 100081514
 弁理士 酒井 一
 (74) 代理人 100082692
 弁理士 蔵合 正博
 (72) 発明者 マルケッティ, ステファノ
 イタリア国イー33010・パニャッコ,
 ヴィア・デイ・ブラッザ, 29
 (72) 発明者 デ・アミチス, フランチェスカ
 イタリア国イー33042・ブットリーオ
 , ヴィア・ブラダマーノ, 5/アー
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物における異種タンパク質の改善された発現のための、5' (5' - UTR) における最適化されたリーダー機能を有する人工DNA配列

(57) 【要約】

C A Aトリヌクレオチドエレメント繰返しとC Tジヌクレオチドエレメント繰返しとの組合せ等の、遺伝子発現に有利なエレメントを含むヌクレオチドリーダー配列 5' - UTR。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C A Aトリヌクレオチド要素の繰返しとC Tジヌクレオチド要素の繰返しとの組合せ等の、遺伝子発現に好ましい要素を含むことを特徴とする、ヌクレオチドリーダー配列 5' - U T R。

【請求項 2】

必須ではないが好ましくは互いに隣接する、2コピー以上のC A A要素からなるオリゴヌクレオチドを意味する p o l y (C A A) 領域を含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 3】

必須ではないが好ましくは互いに隣接する、2コピー以上のC T要素からなるオリゴヌクレオチドを意味する p o l y (C T) 領域を含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 4】

1コピー以上のA C A A T T A C オクタマーを含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 5】

請求項 2 及び 3 に記載の配列の組合せを含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 6】

請求項 2 及び 4 に記載の配列の組合せを含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 7】

請求項 3 及び 4 に記載の配列の組合せを含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 8】

請求項 2、3 及び 4 に記載の配列の組合せを含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 9】

請求項 2 ~ 8 のいずれかに記載の配列と、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーターの転写開始部位である C a M V 3 5 S の I n r 部位との組合せを含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 10】

配列番号 1 に示される配列を含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 11】

5' - U T R の植物発現ベクター中の構築物において、次の要素 C a M V 3 5 S の I n r 部位、p o l y (C A A) n、A C A A T T A C オクタマー及び p o l y (C T) (n は 2 以上の任意の数) が同時に存在する構築物。

【請求項 12】

5' - 3' 相対位置に関係なく、先の請求項のいずれかに記載される 5' - U T R リーダー配列を構成する要素の可能な組合せの全てを含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 13】

先の請求項のいずれか 1 項で報告される配列に相補的な配列を含む、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 14】

20 ~ 200 ヌクレオチド、好ましくは 40 ~ 150 ヌクレオチドを含む長さを有する、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 15】

60 % 未満、好ましくは 50 % 未満の G + C 含量を有する、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 16】

a) 人工合成、又は b) 自然又は人工の配列中における自然の又は誘導される組換えプロセスによって得ることができる配列である、請求項 1 に記載の配列。

【請求項 17】

配列番号 2 ~ 7 に示されるヌクレオチド配列又はそれらの相補配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む増幅プライマー。

【請求項 18】

発見される可能性のある天然リーダー配列 5' - U T R であって、機能的に類似である

限りにおいて先の請求項のいずれかに記載された配列の重要でない変種と思われる、天然リーダー 5' - UTR 配列。

【請求項 19】

先の請求項のいずれかに記載される配列の突然変異に由来する配列であって、機能的に類似である限りにおいて先の請求項のいずれかに記載された配列の重要でない変種を生成すると思われる配列において、前記突然変異は先の請求項のいずれかに記載される配列又はその相補配列における 1 以上のヌクレオチドの欠失、挿入、トランジション、トランスバージョンのいずれかに関するものである配列。

【請求項 20】

請求項 17 に記載される 1 種類以上のプライマーの使用を提供することを特徴とする、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を人工合成するための方法。

10

【請求項 21】

特に、Escherichia coli、Agrobacterium tumefaciens 及び Agrobacterium rhizogenes の種に関連する、先の請求項のいずれかに記載の配列を含むプラスミドを運ぶ細菌株。

【請求項 22】

宿主生物に関係なく、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を含む人工ウイルス株。

【請求項 23】

構成プロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞。

【請求項 24】

組織特異的プロモーター、特に種子特異的プロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞。

20

【請求項 25】

誘導可能なプロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞。

【請求項 26】

フェーズ依存的転写活性を有するプロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞。

【請求項 27】

葉緑体において活性を有するプロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞。

30

【請求項 28】

ミトコンドリアにおいて活性を有するプロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞。

【請求項 29】

メッセンジャー RNA が請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の配列を含むいずれのタンパク質をも一過的に発現することを特徴とする植物であって、一過的な発現がウイルスベクター、アグロ浸潤法、粒子を用いた導入法、エレクトロポレーションによる該タンパク質の生産を意味すると解される植物。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載される配列を含む発現ベクターで安定的に形質転換した双子葉植物。

40

【請求項 31】

ナス科 (Solanaceae)、マメ科 (Papilionaceae) 及びアブラナ科 (Cruciferae) に属する 1 種以上を含む、請求項 30 に記載の植物。

【請求項 32】

請求項 30 又は 31 に記載される双子葉植物の後代。

【請求項 33】

請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載される配列を含む発現ベクターで形質転換した単子葉植物。

50

【請求項 3 4】

イネ科 (Graminaceae (Poaceae)) に属する 1 種以上を含む、請求項 3 3 に記載の植物。

【請求項 3 5】

請求項 3 3 又は 3 4 に記載される単子葉植物の後代。

【請求項 3 6】

バイオテクノロジー上の分子生産のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 3 7】

組み換えタンパク質合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用 10

【請求項 3 8】

ウイルス性、細菌性又は真菌性の病原体に対する抵抗性を誘導することを目的とする組み換えタンパク質合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 3 9】

除草剤に対する抵抗性を誘導することを目的とする組み換えタンパク質合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 4 0】

原料とそれに由来する製品において脂肪酸の組成を変えることを目的とする組み換えタンパク質の合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。 20

【請求項 4 1】

原料とそれに由来する製品において栄養価を変えることを目的とする組み換えタンパク質の合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 4 2】

燃料、ゴム及びバイオプラスチックの生産を目的とする組み換えタンパク質合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 4 3】

工業用酵素とタンパク質商品の合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 4 4】

医薬用タンパク質の合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用 30

【請求項 4 5】

ヒト又は動物を対象とする経口投与ワクチンの合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 4 6】

ヒト又は動物を対象とする注射可能なワクチンの合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 4 7】

好ましくはイディオタイプ特異的でリンパ系腫瘍の治療に用いられる、患者特異的で注射可能なワクチンの合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。 40

【請求項 4 8】

二次代謝産物の生成に関わるタンパク質の合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【請求項 4 9】

形質転換細胞を同定及び / 又は選択する因子として直接的又は間接的に使用可能なタンパク質の合成のための、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載される配列の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、植物における異種タンパク質発現を改善するための人工DNA配列に関する。

【背景技術】

【0002】

バイオテクノロジー分野において、生物に導入した遺伝子の当該生物内での発現レベルを上げる必要が高まっている。この発現レベルは多くの場合満足のいくものではなく、植物や動物のバイオテクノロジーにおける技術革新を産業に利用する際の障害となっている。遺伝子発現レベルの調節能力を特徴付ける多様な構造要素が存在するが、多くのデータが遺伝子発現レベルの調節におけるリーダー領域の重要性を支持している。

【0003】

この場合、広く普及したベクター（例えば、pBI121とその派生物や、pCAMBIAとその派生物）において提案されている、5'（5'-UTR）における非翻訳リーダー配列は、遺伝子組み換え生物における適切な遺伝子発現レベルを目的とするには不適切な多くの問題を抱えている。特に、最大限の収量を確保しなければならない場合（例えば、ヒトにとって有用な化合物の生産のために植物を細胞工場として使用する場合）、5'-UTR配列からくる生産関連の制約を取り除くことが必要とされる。この目的のため、リーダー（タバコモザイクウイルス（TMV）に元来存在する配列）の使用が植物において提案された。しかしこれもまた不完全で余分なものを含み、改良の余地がある。

【0004】

TMVのリーダーに存在する翻訳エンハンサーにおけるpoly(CAA)領域（Gallie and Walbot 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4631-4638(非特許文献1)）は、発現レベルを有意に高める（即ち、in vitro及びin vivoの異種タンパク質翻訳レベルにおけるポジティブな効果がある）ことが知られている（Gallie et al. 1988a Nucleic Acids Res., 16, 883-893(非特許文献2), Gallie et al. 1988b Nucleic Acids Res., 16, 8675-8694(非特許文献3), Gallie 2002 Nucleic Acids Res., 30, 3401-3411(非特許文献4)）。リーダーにおいて、poly(CAA)配列はACAAATTA C配列の3回繰返しと関連があるが（非特許文献2）、デリション実験により、発現レベルの増強に關与する調節エレメントはACAAATTA C配列の単一コピーと(CAA)nモチーフの組合せで成り立っている可能性が示された（非特許文献1）。

【0005】

また、CaMV35Sプロモーター（Guilley et al. 1982 Cell, 30, 763-773(非特許文献5)）の転写開始部位（Inr）は、mRNAの効率的なキャッピングを有利に行うことも知られている。

【0006】

更に、多くの植物のリーダー（Bolte et al. 1996 Plant Mol. Biol. 32, 861-868(非特許文献6)）はCTエレメントに富む配列を有し、このCTリッチ配列は転写レベルを変化させることができることが知られている（Chen et al. 1996 J. Virol., 70, 8411-8421(非特許文献7)）。

【0007】

41ヌクレオチド以上の長さの配列は、最初のAUGを真正の翻訳開始コドンとして認識させることを促すことも知られている（Kozak 1989 J. Cell. Biol., 108, 229-241(非特許文献8)）。例えば、リーダーを29 ntから74 ntに延長すると、in vitro（Kozak 1991, J. Biol. Chem., 266, 19867-19870(非特許文献9)）及びin vivo（非特許文献1）におけるmRNA翻訳レベルの上昇が観察されている。A/T含量がより多いリーダー配列は発現レベルを向上させるが、これは2本鎖mRNA部分の形成（分子がそれ自身の上に折り畳まれることによってもたらされる）が妨げられるからである。実際、このような二次構造には確かに翻訳効率を抑制する効果がある（Pelletier and Sonenberg 1985 Cell, 40, 515-526(非特許文献10)）及びKozak 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2850-2854(非特許文献11)）。更に、ウイルス由来の5'-UTRの一部を植物リーダーに導入すると、レポータータンパク質の発現レベルの上昇が反映されることが知られてい

10

20

30

40

50

る (Dowson Day et al. 1993 Plant Mol. Biol., 23, 97-109(非特許文献 1 2))。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Gallie and Walbot 1992 Nucleic Acids Res., 20, 4631-4638

【非特許文献 2】Gallie et al. 1988a Nucleic Acids Res., 16, 883-893

【非特許文献 3】Gallie et al. 1988b Nucleic Acids Res., 16, 8675-8694

【非特許文献 4】Gallie 2002 Nucleic Acids Res., 30, 3401-3411

【非特許文献 5】Guilley et al. 1982 Cell, 30, 763-773

【非特許文献 6】Bolte et al. 1996 Plant Mol. Biol. 32, 861-868

10

【非特許文献 7】Chen et al. 1996 J. Virol., 70, 8411-8421

【非特許文献 8】Kozak 1989 J. Cell. Biol., 108, 229-241

【非特許文献 9】Kozak 1991, J. Biol. Chem., 266, 19867-19870

【非特許文献 10】Pelletier and Sonenberg 1985 Cell, 40, 515-526

【非特許文献 11】Kozak 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2850-2854

【非特許文献 12】Dowson Day et al. 1993 Plant Mol. Biol., 23, 97-109

【非特許文献 13】Tyc et al. 1984 Eur. J. Biochem., 140, 503-511

【非特許文献 14】Schmitz et al. 1996 Nucleic Acids Res., 24, 257-263

【非特許文献 15】Jefferson et al. 1987 EMBO J., 6, 3901-3907

【非特許文献 16】Podromou and Pearl 1992 Protein Eng., 5, 827-829

20

【非特許文献 17】Wheeler et al. 1996 Gene, 169, 251-255

【非特許文献 18】Prytulla et al. 1996 FEBS Letters, 399, 283-289

【非特許文献 19】Doyle and Doyle 1990

【非特許文献 20】Jefferson 1989

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従って、本発明の目的は、現在の技術水準の問題点を取り除き、植物における組み換えタンパク質の発現レベルを上昇させるリーダー配列を得ることである。

【0010】

30

本出願人は現在の技術水準の問題点を克服し、上述の目的や利点及びその他の目的や利点を得るため、本発明を創出し、試験し、具現化した。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は独立クレームに記述され特徴付けられており、一方、従属クレームは本発明の他の特徴或いは主たる発明思想の変形態様を記述している。

【0012】

前述の目的を達成するために、本発明に係るリーダー機能を有する 5' (5' - UTR) 人工 DNA 配列 (以後、LL - TCK と表す) は、CAA トリヌクレオチドエレメントの繰返しと CT ジヌクレオチドエレメントの繰返しの組合せ等の、遺伝子発現に有利なエ

40

レメントも含む。

【0013】

本発明に係る LL - TCK 配列は人工合成により得られた。この配列は自然には存在しないため、知的活動の成果である。

【0014】

有利な一解決法においては、本発明に係る LL - TCK 配列は、CAA トリヌクレオチドエレメントと CT ジヌクレオチドエレメントの組合せと、リーダー配列に存在する翻訳を活性化させる配列の改変物とを提供する。

【0015】

本発明の一変形態様によれば、本発明に係る配列は poly (CAA) 領域 (即ち、必

50

須ではないが好ましくは互いに隣接する、2コピー以上のCAAエレメントからなるオリゴヌクレオチド)を含む。

【0016】

本発明の他の変形態様においては、本発明に係る配列はpoly(CT)領域(即ち、必須ではないが好ましくは互いに隣接する、2コピー以上のCTエレメントからなるオリゴヌクレオチド)を含む。

【0017】

本発明の一変形態様においては、配列が1コピー以上のACAATTACオクタマーを含むものとして提供される。

【0018】

poly(CAA)領域の配列とpoly(CT)領域の配列の組合せから得られる配列もまた、本発明の範囲に含まれる。

【0019】

poly(CAA)領域の配列と1コピー以上のACAATTACCオクタマーの配列の組合せから得られる配列もまた、本発明の範囲に含まれる。

【0020】

更に、poly(CT)領域の配列と1コピー以上のACAATTACCオクタマーの配列の組合せから得られる配列もまた、本発明の範囲に含まれる。

【0021】

本発明においては、poly(CAA)領域の配列、poly(CT)領域の配列及び1コピー以上のACAATTACCオクタマーの配列の組合せから得られる配列を提供することが可能である。

【0022】

更にまた本発明においては、前記配列の内の1以上の配列と、CaMV35SのInr部位(即ち、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの転写開始部位)との組合せから得られる配列を提供することが可能である。

【0023】

従って、本発明に係るLL-TCK配列は、トランスジェニック植物における異種タンパク質の発現レベルを上昇させることができる。本発明の有利な解決法においては、その種類独自の本来のパターンに従って次のエレメントの組合せが創出されるよう、新規のLL-TCK配列が合成される：

(1) 効率的なmRNAキャッピングのための、CaMV35Sプロモーターの転写開始部位(Inr)；

(2) TMVリーダーに存在する翻訳エンハンサーと同様のpoly(CAA)領域；

(3) 多くの植物リーダーと同様のCTエレメントリッチ配列。

【0024】

更に、LL-TCK配列は、最初のAUGを真正の翻訳開始コドンとして認識させることを促すため(非特許文献8)、41ヌクレオチド以上の長さを有し、全体のG+C含量は40%未満である。

【0025】

本発明における特定の解決法においては、LL-TCK配列は配列番号1(5'-3')に示される配列である。

【0026】

LL-TCKに僅かな変異が入っても、その効果に変化がないことは予想できる。この理由から本発明はまた、本配列に由来するリーダー配列(例えば、CAAトリプレットの欠失や重複、単一の塩基の置換や欠失等の結果生じる配列等)に係るものでもある。

【0027】

LL-TCKの技術革新は、単一のリーダー中に、修飾poly(CAA)エレメント、TMVリーダー由来のオクタマー及び植物由来のCTリッチ配列を合せ加えたものであるという点にある。

10

20

30

40

50

【0028】

従って、本発明の有利な解決法におけるLL-TCK人工配列は、単一のACAAATTACオクタマーと、該オクタマーに対して5'位置に配されたCAA9回繰返しとの存在を提供する。

【0029】

ACAAATTACエレメント内のATTTリプレットが標準的でない翻訳開始部位を表し得るため(Tyc et al. 1984 Eur. J. Biochem., 140, 503-511(非特許文献13)及びSchmitz et al. 1996 Nucleic Acids Res., 24, 257-263(非特許文献14))、LL-TCKリーダーにおいてこのトリプレットは終止コドンと共にフレーム中に挿入された。

【0030】

更に、人工LL-TCKリーダーにおいて、(CT)₄エレメントはACAAATTACオクタマーとpoly(CAA)配列の結合によって得られる調節エレメントの3'末端に付加された。これら2種のエレメントの組合せ(両者どちらも遺伝子発現においてポジティブな効果を有することが知られている)は、自然界には発見されておらず、またこれまでに人間の手によって作成されたことはない。

【0031】

これら2種のエレメントの組合せであるLL-TCKリーダーは、対象遺伝子の翻訳レベルと転写レベルの両方を増強させることができる。

【0032】

35S-LL-TCK::uidA(pSTART)コンストラクトと35S::uidAコンストラクト(元来のリーダーpBI121)をそれぞれ用いて形質転換したタバコ植物体(Nicotiana tabacum)から得られるuidA遺伝子の発現レベルを比較することにより、その効果が示された。pSTARTベクターはpBI121(クロンテック(Clontech))中のリーダー配列をLL-TCKに置換することにより得られた。特に、置換及び操作の対象は、Inr(ACACG)と制限酵素認識部位XbaI(TCTAGA)との間に含まれるpBI121配列であった。AUGコードの認識の可変性を抑制するため、uidAの翻訳開始コドンに隣接する塩基配列は、両コンストラクトにおいて変化させなかった。

【0033】

レポータータンパク質として、uidA遺伝子によりコードされる酵素-グルクロニダーゼ(GUS)を用いるという選択は、タバコには本来のGUS様活性が観察されず、uidA導入遺伝子の発現レベルを、感度、正確性、速度に優れ、容易に実行できるという特徴を有する蛍光定量的検定により測定することができる(Jefferson et al. 1987 EMBO J., 6, 3901-3907(非特許文献15))という事実により決定された。

【0034】

Jefferson(1987; 非特許文献15)の記載に従って測定された、形質転換の後に再生した植物体(T₁世代)におけるGUS酵素活性に関する蛍光定量的測定値は、LL-TCKリーダーの存在が、元来のコンストラクトと比べてどの様にuidA遺伝子発現レベルの大幅な増加(15倍まで)を引き起こすかを示した。

【0035】

分散分析の結果、検討対象であるタバコ2個体群(pSTART及びpBI121で形質転換されたもの)に見られる相違は、これら2群における最良発現個体間の差の場合と同様、統計的に有意であることが立証された。

【0036】

エピジェネティックな変化に由来する効果を除外するため、最初の形質転換の中で最良の個体を自家受精させて得られた後代のT₂を用いて解析を繰返した。この場合もまた、pSTARTで形質転換した植物体は、pBI121のものよりも非常に高いuidA遺伝子発現レベルを示した。特に、全ての植物体を全体として考慮した場合、8.6倍相当の活性の増加が観察され、上記の平均的な発現個体のみを考慮した場合は12.5倍相当の増加が観察された。

10

20

30

40

50

【0037】

uid A 遺伝子の転写における LL - TCK の効果を決定するため、T₂ 植物体を選択 (pBI121 から 10 個体、pSTART から 13 個体) し、リアルタイム RT - PCR を用いる転写レベル解析のために、中間物 GUS のレベルによって特徴付けた。各植物体から抽出した全 RNA から、リアルタイム RT - PCR のテンプレートに用いる cDNA を合成した。2 組のプライマー (1 組は uid A 遺伝子、もう 1 組は内在性遺伝子の 18S RNA に特異的) と、SYBR - Green PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems)) を使用した。コントロールプラスミドを連続希釈したものを用いて 2 本の検量線 (1 本は導入遺伝子、もう 1 本は内在性遺伝子) を作成することにより、正確な定量が可能となった。次に各サンプルにおいて、uid A 遺伝子の転写レベルを、導入遺伝子について検出された mRNA 量とリボソーマル 18S RNA の対応する量との間の % 比によって、相対値として算出した。

10

【0038】

この解析により、pSTART 植物体における uid A 遺伝子の平均転写レベルが、pBI121 植物体で観察されたものよりも 1.7 倍高かったことを証明できた。

【0039】

同様の転写値によって特徴付けられる 7 対の pSTART と pBI121 植物体に対して TEI (翻訳効率指数) を計算した。TEI は蛍光定量アッセイで測定した GUS タンパク質の値と、リアルタイム RT - PCR で決定した相対的に標準化された mRNA の値との比率に等しい。TEI を比較することによって、新規の LL - TCK リーダーが mRNA レベルに効果があるだけではなく、mRNA の翻訳効率を増加させることもできることが明らかになった。

20

【0040】

LL - TCK 配列は、対象遺伝子に関する mRNA 含有量レベルと、存在するタンパク質の最終量レベルの両方に作用することによって、異種タンパク質の発現レベルを増加させることができる。

【0041】

構成要素である CaMV 35S プロモーターと酵素 - グルクロニダーゼ (GUS) をコードする uid A 遺伝子とを用いて LL - TCK の効果をタバコで研究したが、他のプロモーターや他の遺伝子を組合せれば、他の用途も可能である。

30

【0042】

本明細書で報告される実施例において、LL - TCK リーダーはタバコ植物体において uid A の発現を増強するため CaMV 35S プロモーターと組合せて用いられるが、該リーダーはまたタバコ及びジャガイモにおいて、光誘導可能な rbcS 1 プロモーター (GenBank 受託番号: AY163904) の下流や、イネにおいて胚乳特異的、フェーズ依存的な glub4 プロモーター (GenBank 受託番号: AY427571) の下流にも良好に用いられる。これらの実験に用いられる遺伝子は、マウス BCL1 抗体、ヒト - グルコシダーゼ及び合成エラスチン様ポリマーをコードする遺伝子であった。異なる長さ、塩基組成、構造によって特徴付けられる関連のない遺伝子を、本質的に異なる活性のプロモーターの制御下に置き、単子葉だけでなく双子葉でも発現させる実験を行った。この実験において機能の欠失は記録されなかったため、LL - TCK リーダー又は同様に構成された 5' - UTR の有用性は、非特異的 (即ち、特定のプロモーター及び / 又はコード配列との組合せに限定されず、特定の宿主生物種に限定されない) であると言える。従って、本発明の好ましい実施形態は、バイオテクノロジーへの応用を含み、これらは生物的 / 非生物的ストレス及び除草剤に対する抵抗性; バイオ燃料、バイオプラスチック、合成ポリマー及び工業用酵素の生産; バイオ医薬品 (例えば、抗体及びその断片、ワクチン、ヒト酵素、サイトカイン及び成長因子) の分子農業; 食料、飼料及び繊維の品質改良; レポーター及びマーカー遺伝子システムの開発を含む。

40

【0043】

50

更に、植物の発現ベクター内に次のエレメント、即ち、CaMV 35SのInr部位、poly(CAA)n、ACAAATTA Cオクタマー、poly(CT)n(nは2以上のいかなる数字であっても良い)、が同時に存在する5'-UTRを構築することは、本発明の範囲に含まれる：

【0044】

上述の様に発現する5'-UTRリーダー配列を構成するエレメントの全ての可能な組合せ又は関連する変種(その相対的な5'-3'位置に関係なく)は、本発明の範囲に含まれる。

【0045】

更に本発明はまた、前記配列又はその変種に相補的な配列にも関する。

10

【0046】

本発明の一変形態様においては、本発明に係る配列は、20~200ヌクレオチド、好ましくは40~150ヌクレオチドの長さを有する。

【0047】

本発明の一変形態様においては、本発明に係る配列は60%未満、好ましくは50%未満のG+C含量を有する。

【0048】

配列番号2~7に示されるヌクレオチド配列又はそれらの相補配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む1種以上の増幅プライマーもまた、本発明の範囲に含まれる。

20

【0049】

本発明の他の実施形態においては、本発明の配列は：

- a) 人工合成；
 - b) 自然又は人工の配列内における、自然又は誘導される組み換え又は突然変異；
- により得ることができる。

【0050】

本発明の一特徴はまた、1種以上の該増幅プライマーを用いた、前述の配列の人工合成法に関する。

【0051】

本発明に係る配列の自然界に発見される可能性のある、且つ、当業者には重要でない(non-significant)変種とも思われる5'-UTRリーダー配列も、機能的に類似であるならば、本発明の範囲に含まれる。

30

【0052】

本発明に係る配列の突然変異プロセスに由来する配列であって、且つ、当業者には重要でない変種と思われる配列であっても、機能的に類似であるならば、本発明の一部である。この突然変異は、本発明に係る配列又はその相補的な配列における1以上のヌクレオチドの欠失、挿入、トランジション、トランスバージョンのいずれかに関する。

【0053】

本発明はまた、本発明に係る配列を含むプラスミドを運ぶ細菌株(特に、Escherichia coli、Agrobacterium tumefaciens及びAgrobacterium rhizogenesの種に関連する)に関する。

40

【0054】

本発明はまた、宿主生物の種類を問わず、本発明に係る配列を含む人工の細菌株に関する。

【0055】

更に、構成プロモーターの制御下にある、本発明に係る配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞もまた、本発明の範囲に含まれる。

【0056】

本発明は次のものも含む：

- 組織特異的プロモーター、特に種子特異的プロモーターの制御下にある、本発明に

50

係る配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞；

- 誘導可能なプロモーターの制御下にある、本発明に係る配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞；
- フェーズ依存的転写活性を有するプロモーターの制御下にある、本発明に係る配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞；
- 葉緑体で活性を有するプロモーターの制御下にある、本発明に係る配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞；
- ミトコンドリアで活性を有するプロモーターの制御下にある、本発明に係る配列を含む発現ベクターで形質転換した植物細胞。

【0057】

本発明はまた、そのメッセンジャーRNAが本発明に係る配列を含む、あらゆるタンパク質を一過的に発現することを特徴とする植物を含む。一過的な発現とは、ウイルスベクター、アグロ浸潤法 (agroinfiltration)、エレクトロポレーション、粒子を用いた導入法 (particle delivery) による該タンパク質の生産を意味すると解釈されたい。

【0058】

本発明はまた、本発明に係る配列を含む発現ベクターで安定的に形質転換した双子葉植物 (特に、ナス科 (Solanaceae)、マメ科 (Papilionaceae)、アブラナ科 (Cruciferae) に属する種に関連するが、これらに限定されない) と、該双子葉植物の後代に関する。

【0059】

本発明はまた、本発明に係る配列を含む発現ベクターで形質転換した単子葉植物 (特に、イネ科 (Graminaceae (Poaceae)) に属する種に関連するが、これに限定されない) と、該単子葉植物の後代に関する。

【0060】

本発明は、次の活動の内のいずれかのために本発明に係る配列を使用することにも関するため、産業的に有利な用途を提供する。

- バイオテクノロジーによる分子の生産；
- 組み換えタンパク質の合成；
- ウイルス性、細菌性又は真菌性の病原体に対する抵抗性を誘導することを目的とする組み換えタンパク質の合成；
- 除草剤に対する抵抗性を誘導することを目的とする組み換えタンパク質の合成；
- 原料とそれに由来する製品において脂肪酸の組成を変えることを目的とする組み換えタンパク質の合成；
- 原料とそれに由来する製品において栄養価を変えることを目的とする組み換えタンパク質の合成；
- 燃料、ゴム及びバイオプラスチックの生産を目的とする組み換えタンパク質の合成；
- 工業用酵素と商業用タンパク質の合成；
- 医薬用タンパク質の合成；
- ヒト又は動物を対象とする経口投与ワクチンの合成；
- ヒト又は動物を対象とする注射可能なワクチンの合成；
- 好ましくはイディオタイプ特異的でリンパ系腫瘍の治療に用いられる、患者特異的で注射可能なワクチンの合成；
- 二次代謝産物の生成に関わるタンパク質の合成；及び
- 形質転換細胞を同定及び / 又は選抜する因子として、直接的又は間接的に用いられるタンパク質の合成。

本発明のこれら及び他の特徴は、以下、添付図面を参照しつつ、数例の好ましい実施形態の説明により明らかとなるが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】 pBI121のリーダー配列とpSTARTのリーダー配列との比較である。図

10

20

30

40

50

中の下線は、転写開始部位を示す。E c o R V部位と転写開始部位との間の配列と、X b a I部位とu i d AのA T Gトリプレットとの間の配列は、p S T A R Tとp B I 1 2 1で同一であり、これら配列は一部省略する(ドット)。

【図2】トランスジェニックT₁植物体における - グルクロニダーゼ (G U S) の発現レベルを示す。

【図3】トランスジェニックT₂植物体における - グルクロニダーゼ (G U S) の発現レベルを示す。植物体は、各群が最良のT₁形質転換体由来する姉妹植物体を表すよう4群に分けられる。最少の有意差 (P = 0 . 0 1) は、4 . 7 U / m g (全タンパク質) である。

【図4】図4 aは、中間 - グルクロニダーゼ発現レベルにより特徴付けられ、リアルタイムR T - P C Rにより決定される、p S T A R T及びp B I 1 2 1により得られるT₂植物体におけるu i d A (g u s A) の相対転写レベルを示す。類似の転写レベルの7対の植物体が同定されている。図4 bは、類似の転写レベルのT₂植物体の翻訳効率指数 (T E I) の値を示す。T E Iは次のように計算される。各形質転換体に関して、 - グルクロニダーゼ (G U S) 濃度 [U / m g (全タンパク質)] をm R N Aの相対標準化レベルで割る。最大のT E Iは1 . 0 0相当と考えられ、各トランスジェニック植物で記録される値はそれによって表わされる。

【図5】繰返しP C R (recursive PCR) によるL L - T C K合成のためのリバープライマーとフォワードプライマーが重なっている図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0062】

A) 配列番号1に示されるL L - T C K人工リーダー配列の合成

【0063】

A . 1) L L - T C K配列又は同様に構成された5' - U T Rの合成を達成するには、市販の特注サービスを利用した人工合成によるのが非常に便利である。長さが制限された配列であるため、プロモーター配列 (5' フランキン領域の場合) とコード配列 (3' フランキン領域の場合) に元来存在する制限酵素認識部位を末端に有するフランキン領域をリーダーの両側に付加する方法が特に有用である。プロモーター及び/又はコード配列の修飾を同時に計画しているのでなければ、これらフランキン領域がそれぞれ開始部位 (I n r) の上流配列とコード配列を正確に再生するであろうことは、当業者には明らかである。

【0064】

A . 2) 前記リーダー配列を得るための他の手続きとして繰返しP C Rがある (Podromou and Pearl 1992 Protein Eng., 5, 827-829 (非特許文献16)、Wheeler et al. 1996 Gene, 169, 251-255 (非特許文献17) 及びPrytulla et al. 1996 FEBS Letters, 399, 283-289 (非特許文献18))。

【0065】

いずれかの方法によって、L L - T C K配列又は同様に構成された5' - U T Rが得られれば、P C R又はランダム若しくは*in situ*突然変異誘発のために開発された他の手続きによって、容易にリーダーの変種を作成することができる。

【0066】

本実施例では、p B I 1 2 1 (G e n B a n k 受託番号A F 4 8 5 7 8 3) に挿入 (特に、C a M V 3 5 S プロモーターとu i d Aコード配列の間に) するための、繰返しP C RによるL L - T C K合成について報告する。

【0067】

42 ~ 54 n t の間の長さで且つ24 n t 相当の部分重複を有する、プライマーとして用いられる5本の合成オリゴヌクレオチドと、19 n t の末端リバープライマーをそれぞれ配列番号2、3、4、5、6及び7の配列として示す。

【0068】

全プライマーは5' - 3' 方向で記される。配列番号2、4及び6の配列はフォワード

10

20

30

40

50

プライマー、配列番号 3、5 及び 7 はリバースプライマーである。図 5 によると、フォワードプライマーとリバースプライマーは互いにオーバーラップする。

【0069】

LL-TCK の操作と、対象ベクター配列への挿入を容易にするため、E c o R V 部位で始まる末端部を 5' 側に付加し、単一の X b a I 部位を 3' 末端に付加した。

【0070】

従って、35S プロモーターの 3' 末端部 (E c o R V 部位から I n r 領域の間) の改造を提供するようプライマーを設計し、続く p B I 1 2 1 ベクター (クロンテック) への挿入を容易にした。

【0071】

外側のリバースプライマーの 3' 末端に X b a I 部位を導入し、一方 5' には E c o R V 部位が用いられる。

【0072】

p B I 1 2 1 においてこれらの部位はそれぞれ C a M V 3 5 S プロモーターの内側と i d A の翻訳開始シグナルの近傍に存在する。従ってこの合成には、所望の配列と、[E c o R V - X b a I] 断片を置換するためのクローニングとが提供された。

【0073】

C a M V 3 5 S の E c o R V 部位と開始部位との間の領域におけるプロモーター配列を確認するため、また LL-TCK を合成し、クローニング用に 3' 末端に分子フックを提供するため、配列番号 2 ~ 7 に示されるヌクレオチド配列を含むプライマーを設計、作成した。

【0074】

LL-TCK 合成は 1 回の PCR によって行われた。該 PCR は、外側のプライマーである配列番号 2 と 7 (合成部位の両末端に対応する) の濃度が、内側のプライマーである配列番号 3、4、5 及び 6 の濃度よりも 100 倍濃い PCR 反応液を用いた。

【0075】

より厳密な DNA 合成を行うため、50% 減少させた濃度の d N T P と共に、ブルーフリーディング DNA ポリメラーゼを用いた。

【0076】

PCR 反応液は次の通りである：

10 × P f u バッファー (15 mM Mg²⁺ 含有) : 10 µL

配列番号 2 プライマー [10 µM] : 2 µL

配列番号 3 プライマー [0.1 µM] : 2 µL

配列番号 4 プライマー [0.1 µM] : 2 µL

配列番号 5 プライマー [0.1 µM] : 2 µL

配列番号 6 プライマー [0.1 µM] : 2 µL

配列番号 7 プライマー [10 µM] : 2 µL

P f u DNA ポリメラーゼ [3 U / µL] : 0.8 µL

d N T P [各 2.5 mM] : 4 µL

最終量 100 µL になるよう水を加える。

【0077】

特に、DNA の合成と増幅のために、T a q ポリメラーゼ P f u (プロメガ (Promega)) を用いて次のサイクルに付した (1 × (95、5 分間) ; 40 × (95、15 秒間 ; 48、30 秒間 ; 72、20 秒間) ; 1 × (72、7 分間))。

【0078】

PCR 産物をエタノール沈澱により精製し、T A E バッファー中で 1% アガロースゲル電気泳動し、市販のキットを利用してゲルから回収し、A m p l i T a q G o l d (商標) で A テールを付加し、両方の DNA 鎖のシーケンス解析のため、p G E M (登録商標) - T (プロメガ) にライゲーションした。

【0079】

10

20

30

40

50

ライゲーション反応液を用いて大腸菌 (*Escherichia coli*) J M 1 0 1 株のコンピテントセルを形質転換した。二本鎖のシーケンス解析によって、クローニングした配列と設計した配列との間に不一致が全くないことを証明した。

【 0 0 8 0 】

B) L L - T C K 配列を含む植物の発現ベクターの構築

L L - T C K 配列又は同様に構成された 5' - U T R に、可能なフランキング領域又は分子フックを付加することにより、異なる種類の発現ベクターにおける広範囲のクローニングの解決法を提供する。本実施例においては、p B I 1 2 1 (G e n B a n k 受託番号 A F 4 8 5 7 8 3) 中の [E c o R V - X b a I] 断片の代わりに、実施例 1 の [E c o R V - X b a I] 断片をクローニングするのに用いる方法を説明する。p B I 1 2 1 は C a M V 3 5 S プロモーター内部の外に複数の E c o R V 部位を有するため、H i n d I I I と X b a I の制限酵素の使用によって後者のプロモーターを p B I 1 2 1 (クロンテック) から切り出した (非特許文献 1 5) 。

10

【 0 0 8 1 】

T A E バッファー中の 1 % アガロースゲルから断片を回収し、前もって同じ酵素を用いて消化した p U C 1 8 (ファルマシア (P h a r m a c i a) 、 G e n B a n k 受託番号 L 0 8 7 5 2) にサブクローニングした。

【 0 0 8 2 】

前述の通り、p B I 1 2 1 が複数の E c o R V 部位を有するため、この過程が必要とされる。得られた p U C 1 8 / 3 5 S ベクターを、3 5 S プロモーター - L L - T C K リーダーの新規の組合せを作成するために使用した。

20

【 0 0 8 3 】

E c o R V と X b a I (N E B) の消化によって、p G E M - T ベクターから L L - T C K 配列を切り出し、アガロースゲル電気泳動を用いてベクター配列から分離し、次に市販のキットを利用してゲルから回収した。次に p U C 1 8 / 3 5 S ベクターを同じ酵素で消化し、アルカリホスファターゼ (ファルマシア) で処理し、電気泳動し、上記の通りにゲルから回収した。続いて T 4 D N A ライゲース (プロメガ) の存在下 4 時間で 1 6 時間ライゲーション反応を行った。特に、適切な反応バッファーを含む 1 0 μ L 容量中、T 4 D N A ライゲース (1 U) の存在下、[E c o R V - X b a I] 断片 (3 . 5 n g) をベクター (2 5 n g) に組み込んだ。

30

【 0 0 8 4 】

C a M V 3 5 S プロモーターを除去するため、p B I 1 2 1 ベクター (クロンテック) を X b a I と H i n d I I I (N E B) で消化した。次に同じ酵素を用いて、3 5 S - L L - T C K 複合体をクローニングベクター p U C 1 8 から切り出した。上述の様に p B I 1 2 1 ベクターフレームと 3 5 S - L L - T C K インサートを電気泳動し、ゲルから回収した。最後に、p B I 1 2 1 フレームワークに 3 5 S - L L - T C K をライゲーションし、得られた p B I 1 2 1 / 3 5 S - L L - T C K : : u i d A : : N O S ベクターを p S T A R T (図 1) と命名した。

【 0 0 8 5 】

C) L L - T C K 配列を含む発現ベクターによる植物の形質転換

40

L L - T C K 又は同様に構成された 5' - U T R を含むトランスジェニック植物は、*Agrobacterium* spp. 人工株による重感染、フィトウイルス人工株による感染又はトランスフェクション、エレクトロポレーション、粒子を用いた導入、D N A マイクロインジェクションを含む一連の方法によって作出できる。

【 0 0 8 6 】

p S T A R T 発現ベクターをアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) E H A 1 0 5 株にエレクトロポレーションし、形質転換したアグロバクテリウム細胞をタバコ (*Nicotiana tabacum* L., cv. Xanthi) の形質転換に用いた。即ち、カナマイシン (5 0 m g / L) 含有 L B 培地 (2 m L) に、形質転換したアグロバクテリウム細胞を植菌した。細菌培養液を 2 9 時間で 1 6 時間インキュベートした。無菌培養した 3 0 日目の実生又は

50

後期ロゼットの植物体の成熟葉から、コルクボーラーを用いてリーフディスク（直径7 mm）を得た。後者の場合、タバコの葉を蒸留水でリンスし、1%次亜塩素酸ナトリウムで5分間、95%エタノールで30秒表面殺菌し、層流フード下無菌ろ紙上で水気を拭き取った。

【0087】

ナフタレン酢酸（NAA；0.1 mg/L）、6-ベンジルアデニン（BA；1 mg/L）、ショ糖（30 g/L）を含み、寒天（8 g/L）で固めたムラシゲ・スクーグ培地（15 mL）の入ったペトリ皿にリーフディスクを置いた。この移動の後すぐに前記アグロバクテリウム培養液（2 mL）をペトリ皿に注ぎ、リーフディスクを均一に湿らせた。余剰のLB培地を取り除いた後ペトリ皿を密封し、25℃明条件（30.5 μE/平方メートル/秒）で24時間インキュベートした。

10

【0088】

ナフタレン酢酸（NAA；0.1 mg/L）、6-ベンジルアデニン（BA；1 mg/L）、セフトキシム（500 mg/L）、ショ糖（30 g/L）を含み、寒天（8 g/L）で固めたムラシゲ・スクーグ培地（15 mL）の入った新しいペトリ皿に、リーフディスクを移した。これを28℃、16時間/日の照明で1週間インキュベートした；これを、カナマイシン（200 mg/L）が加わる以外は前述の基質と同じ培地に最終的に移した。外植片を3週間毎に継代培養し、再生したシュートをカルス組織から分離し、インドール-3-酪酸（2 mg/L）、セフトキシム（500 mg/L）、カナマイシン（200 mg/L）、ショ糖（30 g/L）を含む半固体のムラシゲ・スクーグ培地に植え付けた。

20

【0089】

推定トランスジェニック植物体をピートの鉢に植え、Powerstar HQI-Tランプ（Osram）（天蓋レベルにおいて200 mW光子/平方メートル/秒）照明を16時間/日、25℃/19℃（明/暗）の温室で育成した。

【0090】

本実施例において、PCRと-グルクロニダーゼアッセイにより形質転換の確認を行った。PCRアッセイにおいては、Doyle and Doyle (1990) (非特許文献19)に従って全DNAを抽出し、次のプライマーを使用した。

フォワード 5' - A C A A T T A C G T A T T T C T C T C T C T A G A - 3' ,
リバーズ 5' - C G A T C G G G G A A A T T C G A G C T C - 3' ,

30

【0091】

フォワードプライマーとリバーズプライマーは、それぞれLL-TCK配列の末端と、NOSTターミネーターの一部にアニーリングし、形質転換していないXanthi植物体では増幅産物を生じない（トランスジェニック植物体では複製配列の長さは予想通り1936 bpである）。

【0092】

標準的な反応液を作成し、次の温度サイクルを用いた場合、再生した植物体の約93%がトランスジェニックであることが判明した。

サイクル：1×（94℃、5分間）；40×（94℃、1分間15秒間；60℃、45秒間；72℃、2分間）；1×（72℃、5分間）。

40

【0093】

植物の形質転換は、GUS組織化学的アッセイ（非特許文献15）とGUS活性の蛍光定量的測定により更に示された。コントロールは、感染していないディスクからin vitroで育成したXanthi植物体からなる。蛍光定量的アッセイの方法と得られた結果とをポイントDで更に詳しく報告する。

【0094】

同様の手順に従って、元来のリーダー配列を含むトランスジェニック植物体を作成し、特徴付けた。他の条件が同じであれば、LL-TCK配列は再生と形質転換の比率に影響がないことを記す。

50

【 0 0 9 5 】

D) 導入遺伝子発現レベルにおける L L - T C K 配列の影響

前記の通り、p B I 1 2 1 プラスミドと p S T A R T プラスミドのそれぞれを、アグロバクテリウムを介したタバコリーフディスクの形質転換に用いた。いずれの場合にも、制御される遺伝子は u i d A (g u s A としても知られる) であるため、L L - T C K と広く普及した p B I 1 2 1 リーダーとで得られる導入遺伝子の発現レベルは、u i d A がコードする - グルクロニダーゼ (E C 3 . 2 . 1 . 3 1) 酵素活性の測定により直接的に比較することができる。各個体群から約 2 0 個体の第一の形質転換体 (第一世代 T₁ に属するトランスジェニック植物体) について P C R により導入遺伝子の有無をアッセイし、続いて - グルクロニダーゼ活性を解析した (図 2) 。ロゼット後期に達したら (硬化 3 0 日) 各植物体から最も若い葉 3 枚を採取し、押しつぶすことにより粗サップを得た (エリッヒ・ボレーネ) ; 粗サップ (1 0 0 μ L) を、高分子ポリビニルピロリドン (P V P) (1 2 m g) を含む 2 容量の抽出液 (Jefferson 1989 (非特許文献 2 0)) と混合した。1 1 , 5 0 0 × g で 1 5 分間遠心分離した後、上清を集め、4 - メチルウンベリフェリル - D - グルクロニド (M U G ; シグマアルドリッチ (S i g m a - A l d r i c h)) を基質に用いて 2 回蛍光定量的に解析した (D y n a Q u a n t 2 0 0 フルオロメーター ; G E ヘルスケア (G E H e a l t h c a r e)) 。サンプルの内因性蛍光、消光及び組み換え酵素以外の要因による基質の分解によるバックグラウンドノイズを測定するための試行を行った。導入遺伝子発現レベルを、粗サップ 1 m L 当たりの - グルクロニダーゼユニットとして測定した。1 ユニットは前記 (非特許文献 2 0) と同じアッセイ条件を用いた際、1 分間当たり 1 n M の 4 - メチルウンベリフェロン (4 - M U) を放出する酵素量によって定義された。分散と平均との間の相互関連を避けるため、データをログ変換して提供した。コロモゴロフ - スミルノフテストによってログデータ分散の正規性を、パートレット検定式によって分散の均一性をチェックした後、分散分析を行った。ダンカンの多重範囲検定法により確率水準 P = 0 . 0 5 で平均を比較した。

10

20

【 0 0 9 6 】

蛍光データについて行われた分散分析は、同一植物体の若い葉の間では有意な分散はないが、植物体間には大きな差があることを示した。特に、合成リーダーは u i d A 発現において非常に大きな増加 (1 5 倍まで) を測定した (表 1) 。

【 0 0 9 7 】

30

【表 1】

ランダムに選抜された T_1 植物体における
 β -グルクロニダーゼ活性(U/mL粗サップ)

pSTART	pBI121
96.10	6.24
89.81	5.37
67.06	5.34
57.89	4.52
33.16	4.20
27.62	3.55
15.97	2.95
4.24	2.89
3.51	2.79
1.85	2.34
1.64	2.30
1.46	1.62
1.21	1.17
0.77	1.12
0.64	0.75
0.46	0.47
0.38	0.23
	0.15

10

20

【0098】

エピジェネティックな変化によってこれらの結果が偏向していないことを示すため、分析を T_2 後代で繰返した。特に、各個体群から最良の T_1 を4個体自家受粉し、得られた種子を、選抜のためカナマイシンリッチ培地に蒔いた。各後代から抵抗性のある5~7個体の T_2 植物体をランダムに選択し、PCRによる遺伝子導入の確認と蛍光定量的アッセイによる β -グルクロニダーゼ活性の測定のために、ロゼット後期まで育成した。酵素レベルは先の粗サップ1mL当たりのユニットに加えて、植物間の代謝の変化を評価するために全タンパク質1mg当たりのユニット(ブラッドフォードアッセイによって測定)でも示した。

30

【0099】

T_1 世代における観察と同様に、新規のリーダーを含む T_2 トランスジェニック植物体は有意により高いuidA発現レベルを示した(図3); pBI121リーダーと比較した場合、8.6倍と12.5倍の活性増加が、それぞれ全植物個体群又は前記平均的な発現個体の評価によって見積もられた(表2)。

40

【0100】

【表 2】

最良のT₁植物体4個体から得られたT₂植物体の
β-グルクロニダーゼ活性(U/mgタンパク質)

pSTART	pBI121
139.07	789
71.27	5.17
45.43	4.44
44.81	3.96
41.67	3.94
32.92	3.78
29.81	3.77
19.79	3.58
18.04	3.55
16.40	3.23
15.10	3.15
13.55	3.09
12.84	2.94
12.32	2.62
10.78	2.45
10.02	1.71
9.00	1.28
8.50	1.22
6.98	1.14
6.57	0.64
5.39	0.52
5.16	0.46
5.01	0.44
3.17	0.31

10

20

30

40

50

【0101】

E) 遺伝子の転写及び翻訳におけるLL-TCK配列の効果

LL-TCK又は同様に構成された5'-UTRにおける、異なるエレメントの組合せは、得られた導入遺伝子の翻訳効率だけでなく、転写における測定可能な改善として反映される。本実施例においてこのような改善は、前述の通りpBI121とpSTARTで得られたT₂タバコトランスジェニック植物体において観察される。その証拠を集めるため、pBI121群又はpSTART群に属する植物体(それぞれ10個体と13個体のT₂)を中間uidA発現レベルによって特徴付け、次のことを決定するため解析した。

i. uidAの平均転写レベル；

ii. 18S RNAの平均転写レベル；及び

iii. 実際に生産されたβ-グルクロニダーゼの量。

【0102】

実験上のエラーを最小にするため、各植物体から1枚の若い葉を採取し、2分割し、半分をRNA分離に用い、もう半分をβ-グルクロニダーゼアッセイに用いた。

【0103】

RNAgents Total RNA Isolation System (プロメガ) を用いて全 RNA を抽出した。RNA (1 μ g) から AMV 逆転写酵素 (プロメガ) を用いてランダムプライマーの存在下ファーストストランド cDNA を合成した。cDNA 合成反応液を 1 : 5 に希釈し、1 μ L をリアルタイム PCR (qRT-PCR) に用いた。

【0104】

SYBR-Green PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ) と特異的プライマー (各 0.3 μ M 最終濃度) を用いて qRT-PCR を行った。全ての反応は、iCycler iQ マルチカラーリアルタイム PCR デテクションシステム (バイオラッド (Bio-Rad)) を用いて、次のプログラムに従って行った。

プログラム: 1 \times (95、10 分間); 50 \times (95、15 秒間; 62、30 秒間; 72、30 秒)。

uidA 転写産物を増幅するため、次のプライマーを用いた:

フォワード 5' - TTACGCTGAAGAGATGCTCGAC - 3'

リバーズ 5' - CCTAAAGAGAGGTTAAAGCCGACAG - 3'

【0105】

18S RNA 標的配列のため、GenBank 受託番号 AJ236016 を元にプライマーを設計した:

フォワード 5' - ACATCCAAAGGAAGGCAGCAG - 3'

リバーズ 5' - GACTCATAGAGCCCGGTATTGTTATT - 3'

【0106】

いずれの場合にも、複製配列の長さは 90 bp であった。各 PCR において、コントロールプラスミドの連続希釈を既知量のインプットコピー数に応じて加え、標準検量線を引いた。特に、10 倍連続希釈 ($10^5 \sim 10^2$ コピー) の uidA 含有 pBI121 プラスミドをテンプレートに用いた。同様の目的のため、18S RNA 遺伝子 (AJ236016) の 550 bp 断片を pGEM-T Easy (プロメガ) にクローニングし、 $10^8 \sim 10^5$ コピーの範囲内で使用した。

【0107】

iCycler iQ リアルタイムデテクションシステムソフトウェア ver.3.0 を用いて uidA 転写産物とコントロール RNA の開始時の量を測定した。各サンプルに対して、少なくとも 3 回の独立した測定を行った。全てのケースにおいて、変動係数 ($VC = SD / \text{平均}$) の最大値は、20% に固定された。uidA と 18S RNA の間の平均転写レベルの % 比を各サンプルに対して計算した。データを標準化するため、最大 uidA 転写レベルは、1.00 相当と考えられ、各トランスジェニック植物体で記録される値は、それによって発現した。

【0108】

qRT-PCR で得られた結果は、pBI121 リーダーを LL-TCK に置換すると、平均 uidA 転写レベルの明らかな増加が測定されることを示した。特に、転写効率は LL-TCK リーダーを含む植物で、1.7 倍高いことが判明した (表 3)。

【0109】

10

20

30

40

【表 3】

数例のT₂植物体における
uidAと18Sの転写産物の間の%比

pSTART	pBI121
0.01371%	0.00881%
0.01189%	0.00832%
0.01132%	0.00761%
0.00968%	0.00437%
0.00960%	0.00315%
0.00896%	0.00308%
0.00578%	0.00282%
0.00556%	0.00234%
0.00425%	0.00225%
0.00315%	0.00158%
0.00272%	0.00072%
0.00201%	
0.00189%	

10

20

【0110】

加えて、uidA転写レベルがほぼ同等の7組の植物体を同定した後(図4a)、グルクロニダーゼ濃度と相対標準化uidA転写レベルとの間の比をなす翻訳効率指数(TEI)を各植物体で算出した(図4b)。TEI値を比較することにより、2種のリーダーは、uidA転写産物の翻訳効率において明らかに異なることが判明し、その翻訳効率は本発明によるリーダーを用いた場合の方が高かった(表4)。

【0111】

【表 4】

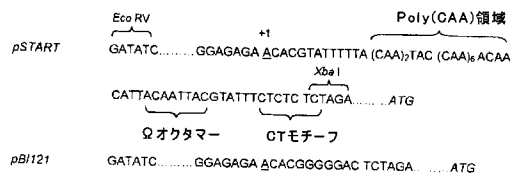
数個体のT₂植物体で測定された
GUS酵素活性とuidA遺伝子の相対転写レベルの間の比

TEI	pSTART	pBI121	TEI
1.00	299.07	103.06	0.34
0.93	277.07	66.58	0.22
0.71	211.87	58.52	0.20
0.68	203.76	19.82	0.07
0.65	195.24	42.97	0.14
0.65	194.12	47.18	0.16
0.52	154.91	20.86	0.07
0.34	102.01	29.52	0.10
0.30	89.48	8.94	0.03
0.27	80.26	12.34	0.04
0.25	73.69	22.81	0.08
0.20	59.70		
0.17	49.40		

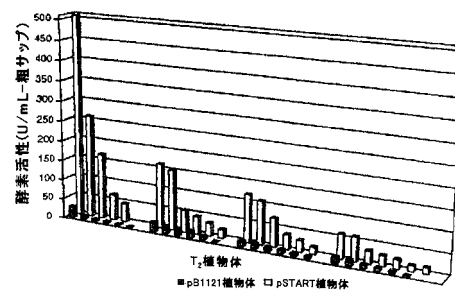
10

20

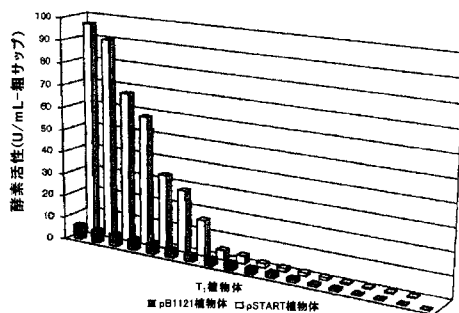
【図 1】



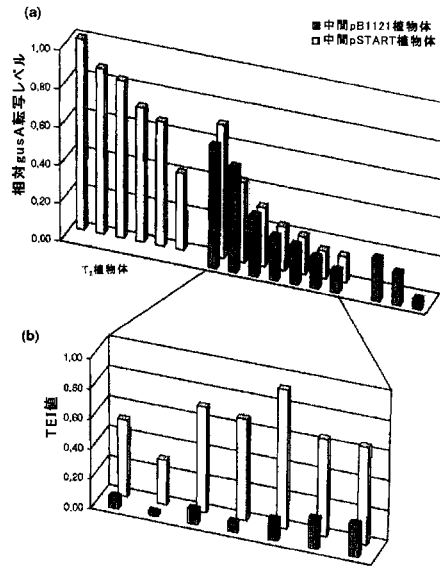
【図 3】



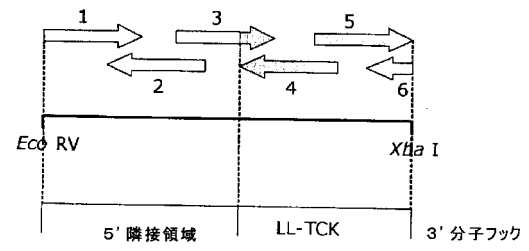
【図 2】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2010514432000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/064590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/82 A01H5/00		
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) C12N A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, EMBL, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 566 525 A (SANDOZ LTD [CH]; SANDOZ AG [DE]; SANDOZ LTD [DE]; SANDOZ AG [DE]) 20 October 1993 (1993-10-20) sequence 23	1-9, 11-49
X	WO 99/31258 A (MOGEN INT [NL]; STUIVER MAARTEN HENDRIK [NL]; SIJBOLTS FLOOR HENDRIK []) 24 June 1999 (1999-06-24) sequence 22	1-9, 11-16, 18,19, 21-49
X	WO 97/06268 A (ZENECA LTD [GB]; JEPSON IAN [GB]; PAINE JACQUELINE ANN MARY [GB]) 20 February 1997 (1997-02-20) figure 11	1-9, 11-16, 18,19, 21-49
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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 "I" 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 April 2008		28/04/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/064590

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/06269 A (ZENECA LTD [GB]; JEPSON IAN [GB]) 20 February 1997 (1997-02-20) figure 8	1-9, 11-16, 18,19, 21-49
X	DATABASE EMBL [Online] 2 February 2003 (2003-02-02), "Synthetic construct duplicated CaMV 35/TMV omega-prime leader sequence fusion promoter, complete sequence." XP002474570 retrieved from EBI accession no. EMBL:AY183361 Database accession no. AY183361 the whole document	1-9, 11-16, 18,19
X	DATABASE EMBL [Online] 27 February 2003 (2003-02-27), "Synthetic construct multi-copy enhancer promoter element, complete sequence." XP002474571 retrieved from EBI accession no. EMBL:AY192160 Database accession no. AY192160 the whole document	1-9, 11-16, 18,19
X	WO 02/36787 A (AVENTIS CROPS SCIENCE SA [FR]; ZINK OLIVIER [FR]; PAGET ERIC [FR]; ROLLA) 10 May 2002 (2002-05-10) page 58, line 5	17,20
X	EP 1 078 985 A (CANADA MAJESTY IN RIGHT OF [CA]) 28 February 2001 (2001-02-28) sequence 24	17
X	US 2006/008911 A1 (BEACHY ROGER N [US]) 12 January 2006 (2006-01-12) sequence 66	17
X	KR 2002 0092034 A (REPUBLIC KOREA MAN RURAL DEV [KR]) 11 December 2002 (2002-12-11) figure 19A	17
X	US 6 187 996 B1 (ISHIGE FUMIHARU [JP] ET AL) 13 February 2001 (2001-02-13) sequence 3	17
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/064590

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GUILLEY H ET AL: "TRANSCRIPTION OF CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS DNA DETECTION OF PROMOTER SEQUENCES AND CHARACTERIZATION OF TRANSCRIPTS" CELL, vol. 30, no. 3, 1982, pages 763-774, XP002474569 ISSN: 0092-8674 figure 4</p>	
A	<p>DOWSON DAY M J ET AL: "Plant viral leaders influence expression of a reporter gene in tobacco" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, SPRINGER, DORDRECHT, NL, vol. 23, no. 1, 1993, pages 97-109, XP002169656 ISSN: 0167-4412 the whole document</p>	1-49
A	<p>GALLIE DANIEL R: "The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 30, no. 15, 1 August 2002 (2002-08-01), pages 3401-3411, XP002474649 ISSN: 0305-1048 the whole document</p>	1-49
A	<p>US 5 891 665 A (WILSON THOMAS M A [GB]) 6 April 1999 (1999-04-06) the whole document</p>	1-49
A	<p>WO 95/06742 A (MONSANTO CO [US]) 9 March 1995 (1995-03-09) the whole document</p>	1-49
A	<p>BOLLE CORDELIA ET AL: "Different sequences for 5'-untranslated leaders of nuclear genes for plastid proteins affect the expression of the beta-glucuronidase gene" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 32, no. 5, 1996, pages 861-868, XP002474703 ISSN: 0167-4412 the whole document</p>	1-49

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/064590

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	FRANCESCA DE' AMICIS ET AL: "Improvement of the pBI121 plant expression vector by leader replacement with a sequence combining a poly(CAA) and a CT motif" TRANSGENIC RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 16, no. 6, 20 January 2007 (2007-01-20), pages 731-738, XP019557514 ISSN: 1573-9368 the whole document	1-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/064590

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0566525	A	20-10-1993	AP 415 A AU 3523793 A CA 2091806 A1 JP 6007170 A MX 9301522 A1 ZA 9301985 A	29-09-1995 23-09-1993 20-09-1993 18-01-1994 29-07-1994 19-09-1994
WO 9931258	A	24-06-1999	AT 278028 T AU 753016 B2 AU 1968099 A BR 9813502 A CA 2313465 A1 CN 1285876 A DE 69826713 D1 DE 69826713 T2 ES 2227906 T3 HU 0100326 A2 JP 2002508186 T MA 24719 A1 PL 341802 A1 US 6987179 B1 ZA 9811228 A	15-10-2004 03-10-2002 05-07-1999 10-10-2000 24-06-1999 28-02-2001 04-11-2004 06-10-2005 01-04-2005 28-06-2001 19-03-2002 01-07-1999 07-05-2001 17-01-2006 14-06-1999
WO 9706268	A	20-02-1997	AP 863 A AR 002914 A1 AU 704172 B2 AU 6625296 A BR 9609873 A CA 2227445 A1 CN 1199425 A CZ 9800369 A3 EP 0846179 A2 HU 9900057 A2 JP 11510694 T NZ 313724 A PL 324880 A1 SK 16998 A3 TR 9800177 T1	04-08-2000 29-04-1998 15-04-1999 05-03-1997 23-03-1999 20-02-1997 18-11-1998 17-06-1998 10-06-1998 28-04-1999 21-09-1999 29-04-1999 22-06-1998 09-09-1998 21-05-1998
WO 9706269	A	20-02-1997	AU 711653 B2 AU 6627896 A BG 102272 A BR 9609886 A CA 2224732 A1 CN 1197483 A CZ 9800291 A3 EP 0843730 A1 HU 9802867 A2 JP 11510695 T NO 980450 A NZ 313750 A PL 324821 A1 RU 2181380 C2 TR 9800131 T1 US 6380463 B1	21-10-1999 05-03-1997 30-09-1998 25-05-1999 20-02-1997 28-10-1998 17-06-1998 27-05-1998 29-03-1999 21-09-1999 01-04-1998 29-04-1999 22-06-1998 20-04-2002 21-05-1998 30-04-2002
WO 0236787	A	10-05-2002	AU 1508702 A BR 0115381 A	15-05-2002 02-09-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/064590

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0236787	A		CA 2427316 A1	10-05-2002
			CN 1636065 A	06-07-2005
			EP 1330530 A2	30-07-2003
			FR 2815969 A1	03-05-2002
			JP 2004518417 T	24-06-2004
			MX PA03003749 A	20-04-2004
			US 2004073966 A1	15-04-2004
EP 1078985	A	28-02-2001	CA 2315949 A1	27-02-2001
			US 6376747 B1	23-04-2002
US 2006008911	A1	12-01-2006	US 2007298499 A1	27-12-2007
KR 20020092034	A	11-12-2002	NONE	
US 6187996	B1	13-02-2001	CA 2181204 A1	15-01-1997
			DE 69635221 D1	03-11-2005
			DE 69635221 T2	13-07-2006
			EP 0754757 A2	22-01-1997
			JP 3761628 B2	29-03-2006
			JP 9131187 A	20-05-1997
US 5891665	A	06-04-1999	NONE	
WO 9506742	A	09-03-1995	AU 7833494 A	22-03-1995
			CA 2169854 A1	09-03-1995
			EP 0716709 A1	19-06-1996
			US 5362865 A	08-11-1994
			US 5659122 A	19-08-1997

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/00 (2006.01) C 1 2 P 21/00 C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, JP, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 パッティ , タマラ
 イタリア国イ - 3 3 0 3 0 ・ ブジャ , ヴィア ・ ベオルキーテ , 1 5

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD08 CA17 CA19
 4B024 AA01 AA03 AA20 BA31 BA80 CA02 DA01 DA05 DA06 EA01
 EA04 FA02 GA14
 4B064 AG01 AG31 CA02 CA11 CA12 CA19 CC24 DA01 DA16
 4B065 AA11X AA26X AA95X AA98X AB01 AC14 BA02 CA24 CA45 CA53
 CA60