

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6436908号  
(P6436908)

(45) 発行日 平成30年12月12日 (2018.12.12)

(24) 登録日 平成30年11月22日 (2018.11.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z N A Z
C 1 2 N 15/67 (2006.01)	C 1 2 N 15/67 Z
C 1 2 N 15/65 (2006.01)	C 1 2 N 15/65 Z
A O 1 K 67/033 (2006.01)	A O 1 K 67/033 5 O 1

請求項の数 3 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2015-531828 (P2015-531828)	(73) 特許権者	501203344
(86) (22) 出願日	平成26年8月6日 (2014.8.6)		国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/071353		茨城県つくば市観音台3-1-1
(87) 国際公開番号	W02015/022971	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成27年2月19日 (2015.2.19)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成29年3月15日 (2017.3.15)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	特願2013-168655 (P2013-168655)		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成25年8月14日 (2013.8.14)	(74) 代理人	100180954
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 漆山 誠一
		(72) 発明者	坪田 拓也
			茨城県つくば市観音台2丁目1-2 国立研究開発法人農業生物資源研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 外因性遺伝子発現ベクター、形質転換体判別マーカー及び形質転換体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるプロモーター、及びそのプロモーター制御下に配置された遺伝子又はその機能ヌクレオチド断片を包含する胚期遺伝子発現ベクターを用いて、チョウ目に属する種の胚期で、前記遺伝子又はその機能ヌクレオチド断片を発現させる方法。

【請求項 2】

チョウ目に属する種の形質転換体判別方法であって、

配列番号 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるプロモーター、及びそのプロモーター制御下に配置された遺伝子又はその機能ヌクレオチド断片を包含する胚期遺伝子発現ベクターを宿主であるチョウ目に属する種に導入する工程、

前記種の胚期で前記遺伝子又はその機能ヌクレオチド断片を発現している個体を形質転換体として判別する工程を含む

前記方法。

【請求項 3】

前記遺伝子が標識遺伝子又はその機能ヌクレオチド断片である、請求項 2 に記載の方法

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、目的の遺伝子の発現を強力に誘導することのできるプロモーターを含む外因性遺伝子発現ベクター、それを利用した形質転換体判別マーカー、及びそれらを導入した形質転換体に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

遺伝子組換え技術は、遺伝子の機能解析や有用タンパク質の生産を行う上で必須の技術である。有用タンパク質の生産にあたっては、従来、主に大腸菌や酵母が宿主として利用されてきたが、大量生産が困難であるという大きな問題があった。そこで、近年では、大量のタンパク質を短期間に合成することのできるカイコ (*Bombyx mori*) が、タンパク質の大量生産系として注目を集めている。カイコを宿主とする場合、外来遺伝子を細胞内に導入する形質転換体、すなわち組換えカイコ (トランスジェニックカイコ) の作製技術が重要となる。カイコでは、トランスポゾン *piggyBac* を用いて外来遺伝子をゲノム内で安定に維持させる技術が確立している (非特許文献 1)。

ところで、遺伝子組換え技術では、形質転換体を作製する技術に加えて、導入した外来遺伝子を保有する形質転換体と、それを保有しない宿主 (非形質転換体) とを正確かつ簡便に判別する技術が必要である。宿主が昆虫の場合、形質転換処理を行う際に目的の遺伝子と共に蛍光タンパク質等の標識遺伝子 (マーカー遺伝子) 並びにそれらの発現を制御するプロモーターを導入し、標識遺伝子の発現の有無に基づいて形質転換体か否かを判別する方法が採用されている。したがって、この方法では、標識遺伝子の発現を強力に、かつ広範囲で誘導することのできるプロモーターの選択が重要となる。

カイコでは、前記プロモーターとして、全身性のアクチン A3 遺伝子プロモーター (非特許文献 1 及び 2)、様々な生物種で汎用性の高いことが知られている眼特異的な 3 × P3 プロモーター (非特許文献 3)、及び最初期プロモーターである IE1 プロモーター (非特許文献 4) が主に使用されている。しかし、これらのプロモーターには、下記に示す問題点があった。

まず、A3 プロモーターでは、胚の時期にはプロモーターの活性が弱いことから、図 1 B に示すように発生初期では形質転換体を判別することができない。それ故、標識遺伝子の発現が確認できる幼虫期まで、形質転換処理を行った個体の全てを一律に飼育する必要があった。そのため作業に多くの無駄や手間、そしてコストが生じていた。また幼虫は動きまわることから、標識遺伝子に基づく表現型が体色のように可視光下で肉眼にて判別できない場合には、選抜作業が行い辛いという問題もあった。例えば、標識遺伝子が蛍光タンパク質をコードする場合、動き回るカイコの幼虫に励起光を照射し続けながら蛍光を発する個体を選抜しなければならない。

次に、3 × P3 プロモーターの場合には、胚期からプロモーター活性を有するため、A3 プロモーターで見られた問題は発生しない。しかし、図 1 D で示すように、発現部位が胚のごく一部分 (図中の矢印で示す部分) に限られることから、その識別及び判断には技術的な習熟が必要であった。また、このプロモーターを有する発現ベクターが宿主ゲノム内に挿入される場合、挿入位置効果等によっては目的の遺伝子の発現が抑制されてしまい、その場合、習熟者でも判別が困難となっていた。さらに、発生初期の段階で標的遺伝子の発現を確認できる期間は、わずか 1 ~ 2 日間に過ぎないという問題もあった。

そして、IE1 プロモーターの場合には、脂肪体、精巣、卵巣では発現誘導活性が見られず、遺伝子発現誘導の活性が全身性ではないという問題があった。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0003】

【非特許文献 1】Tamura T. et al., 2000, Nat Biotechnol, 18: 81 - 84.

【非特許文献 2】Imamura, M., et al., 2003, Bombyx mori. Genetics 165: 1329 - 1340.

【非特許文献 3】Thomas J. - L. et al., 2002, Insect B

10

20

30

40

50

i o c h e m M o l B i o l , 3 2 : 2 4 7 - 2 5 3 .

【非特許文献4】Masumoto et al., 2012 PLoS One e49323

#### 【発明の概要】

#### 【0004】

本発明は、発生初期の段階でトランスジェニック昆虫を簡便に、効率的に、かつ正確に判別するために、胚全体で標識遺伝子の発現を強力に誘導できるプロモーターを開発し、そのプロモーターを組み込んだ遺伝子発現ベクターを形質転換体判別マーカーとして提供することを目的とする。

また、前記プロモーターの活性を利用して、発生初期の段階から全発生ステージを通して所望のタンパク質をコードする遺伝子を強力に発現することのできる遺伝子発現ベクターを提供することを目的とする。

上記課題を解決するために、本発明者らは、トランスポゾンがゲノム中にランダムに挿入された膨大な数のカイコのエンハンサートラップ系統を作出した。そして、その中から当該課題解決のための所望の性質である発生初期の段階から全身でレポーター遺伝子を強く発現することのできる系統（AyFib-431a系統）を分離することに成功した。この系統のゲノム上におけるトランスポゾンの挿入位置を解析した結果、hsp90遺伝子の5'-UTR内部に挿入されており、hsp90遺伝子プロモーターがトランスポゾン内のレポーター遺伝子の発現を誘導したことが明らかになった。

本発明は、当該知見に基づくものであって、以下を提供する。

（1）配列番号1で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドをプロモーターとして包含する外因性遺伝子発現ベクター。

（2）配列番号2で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドをプロモーターとして包含する（1）に記載の外因性遺伝子発現ベクター。

（3）チョウ目に属する種の形質転換用である、（1）又は（2）に記載の外因性遺伝子発現ベクター。

（4）配列番号1で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるプロモーター、及びその下流に標識遺伝子又はその機能ヌクレオチド断片を含む遺伝子発現ベクターからなるチョウ目に属する種の形質転換体判別マーカー。

（5）配列番号2で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるプロモーター、及びその制御下に標識遺伝子を含む遺伝子発現ベクターからなる、（4）に記載の形質転換体判別マーカー。

（6）（1）～（3）に記載のいずれかの外因性遺伝子発現ベクター又は（4）又は（5）に記載の形質転換体判別マーカーを有する形質転換体。

（7）前記外因性遺伝子発現ベクター又は前記形質転換体判別マーカーをゲノム内に有する、（6）に記載の形質転換体。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2013-168655号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0005】

図1は、従来のプロモーターの下流に標識遺伝子を連結した形質転換体判別マーカーを保有するトランスジェニックカイコの胚を示す図である。A及びBは、全身性のアクチンA3遺伝子プロモーターの下流にGFP遺伝子を連結したトランスジェニックカイコである。C及びDは、眼特異的な3xP3プロモーターの下流にDsRed遺伝子を連結したトランスジェニックカイコである。A及びCは白色光での図であり、B及びDはそれぞれA及びCと同視野における蛍光図である。Dにおける矢印は、DsRedの発現が認められる部分を示す。従来のプロモーターでは、発生初期の胚の段階では標識遺伝子の発現による形質転換体の判別が十分とは言い難い。

図2は、カイコのエンハンサートラップ系統群の中から選抜したAyFib-431a系統におけるDsRedの発現を示す図である。A及びA'は胚、B及びB'は幼虫、C

10

20

30

40

50

及びC'は蛹、D及びD'は成虫を示す。また、A、B、C、Dは白色光での図、A'、B'、C'及びD'は蛍光図である。胚から成虫の全発生ステージでDsRedの強い発現が認められる。なお、A'において、矢印はエンハンサートラップに用いたトランスポゾンを含む胚(AyFib431a)を、矢頭はそれを含まない胚を示す。

図3は、実施例1で作製した本発明の外因性遺伝子発現ベクターの一例である。この図に示す外因性遺伝子発現ベクターでは、カイコのhsp90遺伝子プロモーター由来であり、配列番号4で表される塩基配列を含むg2900にGFP遺伝子を連結した構成を有する。

図4は、図3に示した外因性遺伝子発現ベクターを導入したトランスジェニックカイコにおけるGFPの発現を示す図である。A及びA'は胚、B及びB'は幼虫、C及びC'は蛹、D及びD'は成虫を示す。また、A、B、C、Dは白色光での図であり、A'、B'、C'及びD'はGFP蛍光図である。図2に示したオリジナルのAyFib-431a系統と同様に、胚から成虫の全発生ステージでGFPの強い発現が認められた。A'において、矢印は外因性遺伝子発現ベクターが導入された胚を、矢頭はそれが導入されていない胚を示す。

図5は、実施例3で用いた発現ベクターの図である。A：カイコのhsp90遺伝子プロモーター(Bm-hsp90)由来の部分配列にホタルルシフェラーゼを結合した本発明の外因性遺伝子発現ベクターの構成を有する発現ベクターである。この発現ベクターにおけるhsp90遺伝子プロモーター由来の部分配列を後述する図6で示す様々な長さの部分配列に置き換えて、図7で示す各部分配列のプロモーター活性を検証している。B：ドクガOrgyia pseudotsugataのimmediate-early2(IE2)遺伝子プロモーターにウミシタケルシフェラーゼを結合した補正用ベクターである。

図6は、図5Aで示す発現ベクターに用いた様々な長さのカイコhsp90遺伝子プロモーター由来の部分配列を示す図である。g2900を最長として、他のプロモーターは、その5'側(破線領域)を削り込んだものである。

図7は、図5A及びBで示した2つの発現ベクターをカイコ培養細胞に導入して、ルシフェラーゼの発現量を測定し、ホタルルシフェラーゼの発現量をウミシタケルシフェラーゼの発現量で補正した結果、すなわちウミシタケルシフェラーゼに対するホタルルシフェラーゼ活性の相対値(Luc/RLuc)を示す図である。pGL3は、プロモーター配列を含まないコントロール用ベクターである。

図8は、カイコhsp90遺伝子プロモーター由来のg2900と従来使用されてきたカイコアクチンA3遺伝子プロモーター(BmA3)の活性の比較を示す図である。縦軸は、ウミシタケルシフェラーゼに対するホタルルシフェラーゼ活性の相対値(Luc/RLuc)を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0006】

#### 1. 外因性遺伝子発現ベクター

##### 1-1. 概要

本発明の第1の態様は、外因性遺伝子発現ベクターである。本態様の外因性遺伝子発現ベクターは、エンハンサートラップによって得られたカイコ由来のプロモーターに基づく塩基配列を包含し、その下流に目的の遺伝子を組み込んで当該発現ベクターを昆虫の細胞内に導入することによって、前記目的の遺伝子を胚から成虫までの全ステージで、また全身で発現させることができる。

##### 1-2. 構成

本明細書で「遺伝子発現ベクター」とは、目的の遺伝子又はそのヌクレオチド断片(以下、本明細書ではしばしば「目的の遺伝子等」と表記する)を発現可能な状態で包含し、目的の遺伝子等の発現を誘導できる一つの発現系単位をいう。

また、本明細書で「外因性遺伝子発現ベクター」とは、人為的操作を介して外部から導入された外来性の遺伝子発現ベクターのことをいう。ただし、内因性の遺伝子発現ベク

10

20

30

40

50

ーであっても、トランスジェニック昆虫の後代のように、その起源が外因性遺伝子発現ベクターに由来する内因性遺伝子発現ベクターは、本発明の外因性遺伝子発現ベクターに含まれる。

本明細書で「発現可能な状態」とは、目的の遺伝子等を発現可能なように本態様の遺伝子発現ベクター内に組み込むことができること、又は組み込んでいることを意味する。具体的には、目的の遺伝子等が外因性遺伝子発現ベクター内のプロモーターの制御下に配置され得ること、又は配置されていることをいう。

本態様の外因性遺伝子発現ベクターは、目的の遺伝子等の発現を制御するプロモーターを必須構成エレメントとして含む。また、目的の遺伝子等、エンハンサー、マルチクロニングサイト、5' UTR、3' UTR、シグナルペプチドDNA、ターミネーター、標識遺伝子、インスレーター、及びトランスポゾンの逆位末端反復配列等を選択構成エレメントとして含むことができる。以下、本態様の遺伝子発現ベクターの各構成エレメントについて具体的に説明をする。

#### (1) プロモーター

プロモーターは、本態様の外因性遺伝子発現ベクターにおいて中核的役割を担う必須の構成エレメントである。

本態様の外因性遺伝子発現ベクターの含むプロモーターは、1649塩基の配列番号1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドを最小活性単位として含む。この塩基配列は、カイコ (*Bombyx mori*) における hsp90 遺伝子の発現を制御するプロモーター (hsp90 遺伝子プロモーター) の配列に基づく。プロモーターの長さは、前記1649塩基以上であれば特に限定はしないが、好ましくは配列番号1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドの5'末端側に、さらに2kb以内、1.5kb以内、1.3kb以内、1.2kb以内、1.0kb以内、500bp以内、400bp以内、300bp以内、250bp以内、又は200bp以内で延長した長さである。延長するプロモーターの塩基配列も前記1649塩基以外は特に限定はしないが、カイコのhsp90遺伝子プロモーターの塩基配列において、配列番号1で表される塩基配列の上流域(5'末端側)に隣接する塩基配列が好ましい。プロモーターの塩基配列において、特に好ましくは1884塩基の配列番号2で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むプロモーターである。

本態様の外因性遺伝子発現ベクターにおいてプロモーターは、その下流域(3'末端側)の制御領域範囲内に後述する目的の遺伝子等を配置できるように構成されている。

本態様の外因性遺伝子発現ベクターにおいて上記プロモーターは、後述する実施例で示すように、導入する昆虫の細胞内において、遺伝子やその断片の発現を胚発生初期から成虫時まで継続的に、かつユビキタスに制御することのできる構成的活性型プロモーターである。

#### (2) 目的の遺伝子等

本明細書において「目的の遺伝子等(目的の遺伝子又はそのヌクレオチド断片)」とは、所望のタンパク質又はそのペプチド断片をコードする遺伝子又はそのヌクレオチド断片、あるいは機能性核酸をコードするポリヌクレオチドをいう。

本明細書において「所望のタンパク質又はそのペプチド断片」とは、本態様の外因性遺伝子発現ベクターを導入する宿主昆虫の細胞内で発現させるべき任意のタンパク質又はそのペプチド断片である。このタンパク質は、構造タンパク質又は機能タンパク質のいずれであってもよい。構造タンパク質の例としては、コラーゲン、アクチン、ミオシン、フィブリン等の繊維タンパク質、ケラチン、ヒストン等が挙げられる。機能タンパク質の例としては、ペプチドホルモン(インスリン、カルシトニン、パロトルモン、成長ホルモン等)、サイトカイン(上皮成長因子(EGF)、繊維芽細胞成長因子(FGF)、インターロイキン(IL)、インターフェロン(IFN)、腫瘍壊死因子(TNF- )、トランスフォーミング成長因子(TGF- )等)、転写因子(GAL4を含む)、免疫グロブリン、血清アルブミン、ヘモグロビン、酵素等が挙げられる。また、前記所望のタンパク質は、野生型タンパク質又は変異型タンパク質を問わない。例えば、機能獲得型の

ような変異型タンパク質であってもよい。さらに、前記タンパク質又はそのペプチド断片は、その活性の有無も問わない。不活性型の変異型タンパク質であっても本態様の遺伝子発現ベクターを導入した昆虫にドミナントネガティブ効果を付与することができるからである。ただし、通常は活性を有するタンパク質又はその活性ペプチド断片であることが好ましい。また、前記タンパク質は、異なる複数のタンパク質の全部又は一部を融合させたキメラタンパク質であってもよい。例えば、カイコの中腸系腺で特異的に発現するセリシタンパク質のシグナルペプチドと後腸系腺で特異的に発現するフィブロインH鎖(FibH)タンパク質のキメラ遺伝子が挙げられる。さらに、そのタンパク質の由来する生物種が本態様の外因性遺伝子発現ベクターを導入する宿主生物種と異なってもよい。例えば、本態様の外因性遺伝子発現ベクターにコードされたタンパク質がヒト由来のコラーゲンで、その外因性遺伝子発現ベクターを導入する宿主がカイコの場合が挙げられる。

10

本明細書において「機能性核酸」とは、生体内又は細胞内において、特定の生物学的機能、例えば、酵素機能、触媒機能又は生物学的阻害若しくは亢進機能(例えば、転写、翻訳の阻害又は亢進)を有する核酸分子をいう。具体的には、例えば、RNA干渉剤、核酸アプタマー(RNAアプタマー等)、リボザイム、U1アダプター、又は転写因子結合領域等が挙げられる。「RNA干渉剤」とは、生体内においてRNA干渉(RNA interference: RNAi)を誘導し、標的とする遺伝子の転写産物の分解を介してその遺伝子の発現を抑制(サイレンシング)することができる物質をいう。例えば、shRNA(short hairpin RNA)、miRNA(micro RNA)(pri-miRNA及びpre-miRNAを含む)又はアンチセンスRNAが挙げられる。

20

本態様の外因性遺伝子発現ベクターにおいて目的の遺伝子等は、複数含まれていてもよい。目的の遺伝子等がタンパク質をコードする場合、各目的の遺伝子等は同じタンパク質をコードする遺伝子等であってもよいし、異なるタンパク質をコードする遺伝子等であってもよい。ただし、この場合、外因性遺伝子発現ベクターにおいて各目的の遺伝子等は、前記プロモーターの制御領域範囲内に配置されていなければならない。また、目的の遺伝子等は、モノシストロニックmRNAをコードすることもできるし、ポリシストロニックmRNAをコードすることもできる。

本態様の外因性遺伝子発現ベクターにおいて目的の遺伝子等は、発現対象物であり、構成上重要な構成エレメントである。しかし、目的の遺伝子等は、必須構成エレメントではない。これは、目的の遺伝子等を組み込むべき領域が外因性遺伝子発現ベクター内で目的に応じて交換可能な「カセット領域」だからである。それ故、目的の遺伝子等が組み込まれるまで、そのカセット領域は、「空」の状態であっても構わない。ただし、そのカセット領域が空の状態の場合には、発現対象物が存在しないことから、本態様の外因性遺伝子発現ベクターとしての機能は発揮し得ない。したがって、目的の遺伝子等を組み込むべきカセット領域が空の状態の本態様の外因性遺伝子発現ベクターは、いわば静止状態にある外因性遺伝子発現ベクターと解することができる。

30

### (3) マルチクローニングサイト

マルチクローニングサイトは、本態様の外因性遺伝子発現ベクターの選択構成エレメントである。構成する塩基配列や包含する制限酵素部位の種類及び数については、制限はない。また、外因性遺伝子発現ベクターにおけるマルチクローニングサイトの数や配置される位置についても、制限はないが、前記プロモーターの制御領域範囲内で、目的の遺伝子等を組み込むべきカセット領域周辺に配置することが好ましい。そのような位置に配置することで、クローニングした目的の遺伝子等を本態様の外因性遺伝子発現ベクターに簡便に導入することができるからである。

40

### (4) 5' UTR及び3' UTR

5' UTR及び3' UTRは、それ自身がタンパク質やその断片、又は機能性核酸をコードしない非翻訳領域からなるポリヌクレオチドである。本態様の外因性遺伝子発現ベクターでは、選択構成エレメントである。それぞれ目的の遺伝子等のmRNAコード領域の

50

開始コドンの上流（5'末端側）及び終止コドンの下流（3'末端側）に配置される塩基配列で構成され、3'UTRは、ポリAシグナルを含むことができる。

#### （5）シグナルペプチドDNA

シグナルペプチドDNAは、シグナルペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドであって、本態様の外因性遺伝子発現ベクターの選択構成エレメントである。シグナルペプチドは、目的の遺伝子等の発現によって生合成されたタンパク質又はその断片を細胞外に分泌させる場合に必要となる細胞外移行シグナルである。シグナルペプチドは、通常、分泌性タンパク質のN末端側に配置されており、分泌前にシグナルペプチダーゼによって切断除去される。したがって、本態様の外因性遺伝子発現ベクターにおいても所望のタンパク質又はそのペプチド断片がシグナルペプチドを有する場合には、シグナルペプチドは、所望のタンパク質又はそのペプチド断片のN末端側に配置される。シグナルペプチドは、通常、N末端側にLysやArgのような正電荷を有するアミノ酸を配し、それに続いてAla、Leu、Val、Ile、Val、及びPheのような疎水性の高いアミノ酸配列を配する。また、シグナルペプチドのC末端側には、シグナルペプチドの切断と分泌を促進するシグナル配列後挿入配列及び/又は融合タンパク質からシグナルペプチドを切断するシグナルペプチダーゼ認識部位を含むアミノ酸配列を有することもできる。シグナルペプチドのアミノ酸配列は、特に限定はしない。通常は、3～60アミノ酸の範囲内にあればよい。したがって、シグナルペプチドDNAの塩基長も9～180塩基の範囲にあればよい。

本態様の外因性遺伝子発現ベクターにおけるシグナルペプチドDNAとして、限定はしないが、配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むカイコのセリシン1シグナルペプチドをコードするシグナルペプチドDNA（例えば、配列番号7で示される塩基配列を含むDNA）、配列番号8で示されるアミノ酸配列を含むカイコのセリシン2シグナルペプチドをコードするシグナルペプチドDNA（例えば、配列番号9で示される塩基配列を含むDNA）、配列番号10で示されるアミノ酸配列を含むカイコのセリシン3シグナルペプチドをコードするシグナルペプチドDNA（例えば、配列番号11で示される塩基配列を含むDNA）が挙げられる。

#### （6）ターミネーター

ターミネーターは、本態様の外因性遺伝子発現ベクターにおいて目的の遺伝子等の発現時にその転写を終結できる塩基配列で構成される選択構成エレメントである。

#### （7）標識遺伝子

標識遺伝子は、選抜マーカーとも呼ばれる標識タンパク質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、本態様の外因性遺伝子発現ベクターの選択構成エレメントである。標識タンパク質には、酵素、蛍光タンパク質、色素合成タンパク質又は発光タンパク質が含まれる。この標識遺伝子及び標識タンパク質の構成については、第2態様で詳述することから、ここではその具体的な説明を省略する。

#### （8）インスレーター

インスレーターは、本態様の外因性遺伝子発現ベクターの選択構成エレメントであって、周囲の染色体のクロマチンによる影響を受けることなく、その配列に挟まれた遺伝子の転写を、安定的に制御できる塩基配列である。例えば、ニワトリのcHS4配列やショウジョウバエのgypsy配列などが挙げられる。

#### （9）トランスポゾンの逆位末端反復配列

「トランスポゾンの逆位末端反復配列（Inverted terminal repeat sequence）」は、本態様の外因性遺伝子発現ベクターが相同組換え可能な発現ベクターの場合に含まれ得る選択構成エレメントである。逆位末端反復配列は、通常は2個1組で使用され、トランスポゾンとしては、piggyBac、mariner、minos等を用いることができる（Shimizu, K. et al., 2000, Insect Mol. Biol., 9, 277-281; Wang W. et al., 2000, Insect Mol Biol 9(2): 145-55）。

#### （10）遺伝子発現ベクター

本態様の外因性遺伝子発現ベクターは、様々な遺伝子発現ベクターを利用することができる。例えば、プラスミド若しくはバクミド (Bacmid) のような自律複製可能な発現ベクター、ウイルスベクター、又は染色体中に相同組換え可能な発現ベクター若しくはそれを宿主のゲノム中に挿入したゲノムの一部が挙げられる。発現ベクターは、大腸菌等の他の細菌内でも複製可能なシャトルベクターとすることもできる。

### 1 - 3 . 用途

本態様の外因性遺伝子発現ベクターは、昆虫の細胞内に導入し、目的の遺伝子等をその昆虫細胞内で発現させることを目的とした形質転換用として用いることができる。

本態様の外因性遺伝子発現ベクターを導入する昆虫の種類については、限定はしない。例えば、チョウ目 (Lepidoptera)、甲虫目 (Coleoptera)、ハチ目 (Hymenoptera)、カメムシ目 (Hemiptera)、アザミウマ目 (Thysanoptera)、バッタ目 (Orthoptera)、アミメカゲロウ目 (Neuroptera)、又はトビケラ目 (Trichoptera) に属する種が挙げられる。好ましくは産業上利用可能な昆虫である。「産業上利用可能な昆虫」とは、人間社会において有益性のある昆虫をいう。例えば、絹糸を提供する絹糸虫、ハチミツやロイヤルゼリーを提供するミツバチ科 (Apidae) に属する種、シェラックを提供するラックカイガラムシ (Laccifer lacca)、花粉媒介用として有用なミツバチ科 (Apidae) に属する種、生物農薬として利用可能なハナカメムシ科 (Anthoridae) 又はテントウムシ科 (Coccinellidae) に属する肉食性の種が該当する。本明細書において「絹糸虫」とは、絹糸腺を有し、絹糸を吐糸することのできる昆虫の総称をいう。通常は、幼虫期に営巣、営繭又は移動のために吐糸することのできる種を指す。具体的には、チョウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目、トビケラ目に属する種である。好ましくは、多量の絹糸を吐糸できるチョウ目に属する種である。カイコガ科 (Bombycidae)、ヤママユガ科 (Saturniidae)、イボタガ科 (Brahmaeidae)、オビガ科 (Eupterotidae)、カレハガ科 (Lasiocampidae)、ミノガ科 (Psychidae)、ヒトリガ科 (Archtiidae)、ヤガ科 (Noctuidae) 等に属する種は本明細書の絹糸虫として好ましい。Bombyx 属、Samia 属、Antheraea 属、Saturnia 属、Attacus 属、Rhodinia 属に属する種、具体的には、カイコ、クワコ (Bombyx mandarina)、シンジュサン (Samia cynthia; エリサン Samia cynthia ricini 及びシンジュサンとエリサンの交配種を含む)、ヤママユガ (Antheraea yamamai)、サクサン (Antheraea pernyi)、ヒメヤママユ (Saturnia japonica)、オオミズアオ (Actias gnoma) 等は、より好ましい。さらに、産業上の利用可能性に加えて、移動性が限定される昆虫及び/又は閉鎖空間内で飼育可能な昆虫は、本態様の遺伝子発現ベクターを導入する昆虫として特に好適である。カイコはその典型例である。

### 1 - 4 . 導入方法

本態様の外因性遺伝子発現ベクターの導入方法について、説明をする。

本態様の外因性遺伝子発現ベクターを導入する宿主は、昆虫由来の細胞 (株化細胞を含む)、昆虫由来の組織、又は昆虫個体のいずれであってもよい。細胞若しくは組織の場合にはそれが採取された又はそれが由来する個体の発生ステージは問わない。同様に、個体の場合にはその個体の発生ステージは問わない。胚、幼虫、蛹、又は成虫のいずれのステージであってもよい。また、宿主の雌雄も問わない。

導入方法は、導入する外因性遺伝子発現ベクターの種類に応じて当該分野で公知の方法によって行えばよい。例えば、導入する宿主がカイコで、外因性遺伝子発現ベクターがトランスポゾンの逆位末端反復配列 (Handler AM. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 7520 - 5) を有するプラスミドの場合であれば、Tamura らの方法 (Tamura T. et al., 2000, Nature Biotechnology, 18, 81 - 84) を利用することができる。簡単に説明すると、本態様の外因性遺伝子発現ベクターと共にトランスポゾン



転移酵素をコードするDNAを有するヘルパーベクターをカイコの初期胚にインジェクションすればよい。前記ヘルパーベクターとしては、例えば、pHA3PIGが挙げられる。本態様の外因性遺伝子発現ベクターが目的の遺伝子等の一つとして標識遺伝子を含む場合には、その遺伝子等の発現に基づいて形質転換体を簡便に選抜することができる。これについては、第2態様で詳述する。

#### 1 - 5 . 効果

本態様の外因性遺伝子発現ベクターによれば、それを昆虫細胞内に導入することで、胚から成虫に至る全ての発生ステージで、個体全身において目的の遺伝子を強力に発現を誘導できる。

#### 2 . 形質転換体判別マーカー

##### 2 - 1 . 概要

本発明の第2の態様は、形質転換体判別マーカーである。本態様の形質転換体判別マーカーを導入した昆虫、すなわち形質転換体は、初期胚の段階から容易に判別することができる。

##### 2 - 2 . 構成

本態様の形質転換体判別マーカーの構成は、第1態様の外因性遺伝子発現ベクターと同一である。ただし、第1態様の外因性遺伝子発現ベクターでは、包含し得る目的の遺伝子等が任意のタンパク質又はそのペプチド断片をコードできたのに対して、本態様の形質転換体判別マーカーでは、第1態様の外因性遺伝子発現ベクターの目的の遺伝子等が標識遺伝子又はその機能ヌクレオチド断片に特定されている。つまり、本態様の形質転換体判別マーカーは、前記第1態様の外因性遺伝子発現ベクターの一実施形態とみなすことができる。基本構成が第1態様の外因性遺伝子発現ベクターと共通することから、ここでは本態様に特徴的な構成についてのみ、以下で具体的に説明をすることとする。

##### (1) 標識遺伝子

本明細書において「標識遺伝子」とは、標識タンパク質をコードする遺伝子である。本明細書において「標識タンパク質」は、その活性に基づいて標識遺伝子の発現の有無を判別することのできるポリペプチドをいう。したがって、標識タンパク質の活性に基づいて、本態様の形質転換体判別マーカーを保有している形質転換体を容易に判別することができる。ここで「活性に基づいて」とは、活性の検出結果に基づいて、という意味である。活性の検出は、標識タンパク質の活性そのものを直接的に検出するものであってもよいし、色素のような標識タンパク質の活性によって発生する代謝物を介して間接的に検出するものであってもよい。検出は、化学的検出（酵素反応的検出を含む）、物理的検出（行動分析的検出を含む）、又は検出者の感覚的検出（視覚、触覚、嗅覚、聴覚、味覚による検出を含む）のいずれであってよい。

標識タンパク質の種類は、当該分野で公知の方法によってその活性を検出可能な限り、特に限定はしない。好ましくは検出に際して形質転換体判別マーカーを保有する宿主、すなわち形質転換体に対する侵襲性の低い標識タンパク質である。例えば、蛍光タンパク質、色素合成タンパク質、発光タンパク質、外分泌タンパク質、外部形態を制御するタンパク質等が挙げられる。蛍光タンパク質、色素合成タンパク質、発光タンパク質、外分泌タンパク質は、形質転換体の外部形態を変化させることなく特定の条件下で視覚的に検出可能なことから、形質転換体に対する侵襲性が非常に低く、また形質転換体の判別及び選抜が容易なことから特に好適である。

本明細書において「蛍光タンパク質」は、特定波長の励起光を照射したときに特定波長の蛍光を発するタンパク質をいう。天然型及び非天然型のいずれであってよい。また、励起波長、蛍光波長も特に限定はしない。具体的には、例えば、CFP、RFP、DsRed (3xP3-DsRedのような派生物を含む)、YFP、PE、PerCP、APC、GFP (EGFP、3xP3-EGFP等の派生物を含む)等が挙げられる。

本明細書において「色素合成タンパク質」は、色素の生合成に関与するタンパク質であり、通常は酵素である。ここでいう「色素」とは、形質転換体に色素を付与することができる低分子化合物又はペプチドで、その種類は問わない。好ましくは個体の外部色彩とし

10

20

30

40

50

て表れる色素である。例えば、メラニン系色素（ドーパミンメラニンを含む）、オモクローム系色素、又はプテリジン系色素が挙げられる。

本明細書において「発光タンパク質」とは、励起光を必要とすることなく発光することのできる基質タンパク質又はその基質タンパク質の発光を触媒する酵素をいう。例えば、基質タンパク質としてのルシフェリン又はイクオリン、酵素としてのルシフェラーゼが挙げられる。

本明細書において「外分泌タンパク質」とは、細胞外又は体外に分泌されるタンパク質であり、外分泌性酵素の他、フィブロインのような繊維タンパク質やセリシンが該当する。外分泌性酵素には、プラスチックのような薬剤の分解又は不活化に寄与し、宿主に薬剤耐性を付与する酵素の他、消化酵素が該当する。

標識遺伝子は、形質転換体判別マーカーにおいてプロモーターの下流に発現可能な状態で配置される。

#### (2) 機能ヌクレオチド断片

機能ヌクレオチド断片は、前記標識遺伝子と同様に、形質転換体判別マーカーにおいてプロモーターの下流に発現可能な状態で配置される。

本明細書において「(その)機能ヌクレオチド断片」とは、標識遺伝子の断片であって、機能ペプチド断片をコードするヌクレオチドである。「機能ペプチド断片」とは、標識タンパク質の断片で、かつその活性を保持するペプチドをいう。機能ペプチド断片は、標識タンパク質の活性を保持する限り、そのアミノ酸長は問わない。

#### (3) その他

本態様の形質転換体判別マーカーにおいて、標識遺伝子及び/又は機能ヌクレオチド断片は、第1態様に記載のプロモーターの制御範囲内に2つ以上含まれていてもよい。この場合、各標識遺伝子や機能ヌクレオチドは同じ活性を有する標識タンパク質をコードするものであってもよいし、異なる活性を有する標識タンパク質をコードするものであってもよい。例えば、蛍光タンパク質であるGFPをコードする遺伝子を2つ含む場合や、GFPをコードする遺伝子と色素合成タンパク質をコードする遺伝子を組み合わせて含む場合が挙げられる。前者の場合、形質転換体判別マーカーあたりの標識タンパク質の発現量を倍増することができ、形質転換体の判別感度を増強することができる利点がある。また、後者の場合、蛍光と色彩という異なる2つの視点から形質転換体を検出することができるため、判別精度を高めることができる利点がある。

本態様の形質転換体判別マーカーは、標識遺伝子及び/又は機能ヌクレオチド断片に加えて、プロモーターの制御範囲内に第1態様に記載の目的のタンパク質やそのペプチド断片、あるいは機能性核酸をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。例えば、ある変異型タンパク質を昆虫個体の全身で発現させて、その機能解析を行いたい場合に、その変異型タンパク質と標識タンパク質をコードする遺伝子をプロモーターの制御範囲内に配置した形質転換体判別マーカーを昆虫個体に導入することで、標識タンパク質による形質転換体の判別と変異型タンパク質の個体全身における機能解析を同時に行うことができる。

### 2 - 3 . 効果

本態様の形質転換体判別マーカーによれば、それを導入した宿主昆虫において、胚期から成虫期に至る全発生ステージにおいて、全身で包含する標識遺伝子又はその機能ヌクレオチド断片を強力に発現することができる。それ故に、従来方法では判別が困難であった発生初期の胚であっても、形質転換体を容易に判別することができる。

### 3 . 形質転換体

#### 3 - 1 . 概要

本発明の第3の態様は形質転換体である。本態様の形質転換体は、第1態様の外因性遺伝子発現ベクター又は第2態様の形質転換体判別マーカーを含むことを特徴とする。本態様の形質転換体は、第1態様の外因性遺伝子発現ベクター又は第2態様の形質転換体判別マーカーに包含された目的の遺伝子等を全発生ステージにおいて、個体全体で発現することができる。

### 3 - 2 . 構成

本態様の形質転換体は、第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクター又は第 2 態様の形質転換体判別マーカーを細胞内に包含する。すなわち、第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクター又は第 2 態様の形質転換体判別マーカーの導入によって形質転換された宿主が本態様の形質転換体に該当する。前述のように、第 2 態様の形質転換体判別マーカーの基本構成は第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターと同一であり、第 2 態様の形質転換体判別マーカーは第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターの一実施形態とみなすことができることから、本態様では第 2 態様の形質転換体判別マーカーを第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターに包含することとする。したがって、本態様の形質転換体は、宿主及び第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターで構成されている。以下、具体的に説明をする。

10

#### ( 1 ) 宿主

本態様の形質転換体を構成する宿主は、前記第 1 態様の「 1 - 3 . 用途」に記載した昆虫と同じである。その種類は限定しないが、産業上の利用可能な昆虫であることが好ましく、さらに移動性が限定される昆虫及び / 又は閉鎖空間内で飼育可能な昆虫は、より好ましい。例えば、カイコが好適な宿主として挙げられる。宿主の状態も「 1 - 4 . 導入方法」に記載した宿主の状態と同じである。すなわち、昆虫由来の細胞（株化細胞を含む）、昆虫由来の組織、又は昆虫個体であり、いずれの場合にもその種類、発生ステージ、及び雌雄は問わない。

宿主は、後述する第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターを導入した形質転換体第 1 世代だけでなく、その後代を含む。本明細書において「後代」とは、形質転換体第 1 世代の子孫個体であって、第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターをその細胞内に保持している個体をいう。後代は、第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクター保持する限りにおいてその世代数を問わない。

20

#### ( 2 ) 第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクター

第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターの具体的な構成については、第 1 態様に詳述していることから、ここではその説明を省略する。

第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターは、宿主細胞内で宿主ゲノム内に組み込まれた状態で存在することができ、また宿主ゲノムとは独立した状態で存在することもできる。宿主ゲノムとは独立した状態で存在する場合、その存在は一時的なものであってもよい。この場合、本態様の形質転換体は、一時的又は一世代限定的なものとなる。本態様の形質転換体を安定的かつ持続的なものとするためには、第 1 態様の外因性遺伝子発現ベクターが宿主ゲノム内に組み込まれていることが好ましい。

30

#### 【実施例】

#### 【 0 0 0 7 】

< 実施例 1 : 外因性遺伝子発現ベクターを有するカイコ形質転換体の作出 >

#### ( 目的 )

エンハンサートラップ系統群から分離されたカイコ A y F i b - 4 3 1 a 系統では、h s p 9 0 遺伝子プロモーターの制御下に挿入されたレポーター遺伝子がカイコの胚期から成虫期まで、全身で強く発現を誘導することが明らかとなった。そこで、本発明の外因性遺伝子発現ベクターとして、この h s p 9 0 遺伝子プロモーターを利用した発現ベクターを構築し、本発明の効果を奏することを確認する。

40

#### ( 方法 )

#### ( 1 ) 外因性遺伝子発現ベクターの構築

まず、p B a c A 3 d G A L 4 / 3 x P 3 D s R e d ベクター ( U c h i n o K . e t a l . , 2 0 0 6 , J I n s e c t B i o t e c h n o l S e r i c o l , 7 5 : 8 9 - 9 7 ) の B a m H I 部位を N h e I 部位に改変した p B a c A 3 d G A L 4 / 3 x P 3 D s R e d ( A N B ) ベクターを作製した。このベクターを A s c I 及び X b a I で切断して、A 3 d G A L 4 断片を除き、その部分に P C R で増幅した G F P 及び S V 4 0 ターミネーター配列を挿入して p B a c G F P / 3 x P 3 D s R e d ベクターを作製した。

50

次に、カイコ *hsp90* 遺伝子の転写開始点から上流約 2.9 kb の領域 (g2900 : 2884 bp) を *hsp90* 遺伝子プロモーターの候補領域として、フォワードプライマー (配列番号 12) 及びリバースプライマー (配列番号 13) を用いて、カイコ白/C 系統のゲノムを鋳型として PCR でその領域を増幅した。DNA ポリメラーゼには、KODplus (TOYOBO 社) を使用した。PCR の反応条件は 94 5 分で熱変性後、94 30 秒、60 30 秒、68 3 分を 35 サイクルで行った。増幅産物を PCR-Blunt II - TOPO ベクター (life technologies 社) に挿入してクローニングし、PCR-Blunt II - g2900 を得た。クローニングした領域の塩基配列をシーケンシングにより確認した後、PCR-Blunt II - g2900 を鋳型として、5' 末端に *NheI* 部位を配置した、フォワードプライマー (配列番号 14) 及びリバースプライマー (配列番号 15) を用いて、PCR を行って g2900 配列を再増幅した。

10

最後に、前記再増幅断片を pBacGFP/3xP3DsRed ベクターの GFP 遺伝子の上流に位置する *XbaI* サイトに挿入して、図 3 に示す本発明の外因性遺伝子発現ベクター (形質転換判別マーカー) である pBacg2900GFP/3xP3DsRed を得た。

#### (2) 外因性遺伝子発現ベクターの精製

構築した外因性遺伝子発現ベクターは、HiSpeed Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いて、添付のプロトコルに従い、精製した。さらに、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製して、0.5 mM リン酸バッファー (pH 7.0) / 5 mM 塩化カリウムバッファーに溶解した。

20

#### (3) トランスジェニックカイコの作出

上記で作出した外因性遺伝子発現ベクター pBacg2900GFP/3xP3DsRed を、トランスポゼースを発現するヘルパープラスミド pHA3PIG (Tamura Tet al., 2000, Nature Biotechnology, 18 81-84) と 1:1 の割合で混合し、産卵後 2~8 時間のカイコ w1-pnd 系統 (白眼・白卵・非休眠系統) の胚にインジェクションした。インジェクション後の胚は、穴を瞬間接着剤 (コニシ #30523) で塞ぎ、加湿状態、25℃ で孵化するまでインキュベートした。孵化した幼虫を飼育し、兄妹交配、あるいは非インジェクション個体との交配を行った。得られた胚を 3xP3DsRed の発現の有無で選抜し、本態様の外因性遺伝子発現ベクターを含むトランスジェニックカイコ系統を獲得した。

30

獲得した本発明の外因性遺伝子発現ベクターを含むトランスジェニックカイコ系統において、g2900 のプロモーター活性を確認するために、g2900 の下流に連結した GFP 遺伝子の発現を GFP 蛍光により確認した。GFP 蛍光の観察には蛍光実体顕微鏡 (MZ16FA; ライカ社) を用いた。

#### (結果)

図 4 に結果を示す。g2900 を含む本発明の外因性遺伝子発現ベクターは、オリジナルの *AyFib-431a* 系統と同様に、胚から成虫に至る全ての発生ステージで、個体全身において制御領域下の GFP 遺伝子を強力に発現誘導でき、本発明の効果を奏し得ることが立証された。

40

#### <実施例 2: カイコ *hsp90* 遺伝子プロモーターの活性領域の決定>

##### (目的)

実施例 1 の結果から g2900 がカイコの *hsp90* 遺伝子プロモーター活性を有することが明らかとなった。そこで、本実施例では、g2900 に基づいて、本発明の外因性遺伝子発現ベクターのプロモーターとして機能し得る *hsp90* 遺伝子プロモーターの最小活性領域を決定する。

##### (方法)

##### (1) 外因性遺伝子発現ベクターの構築

g2900 配列又はその部分配列のプロモーター活性の測定を行うために、図 5 A に示すホタル由来の発光酵素タンパク質ルシフェラーゼ遺伝子上流に各プロモーター配列を

50

挿入した外因性遺伝子発現ベクターを構築した。

g 2 9 0 0 全長を挿入した外因性遺伝子発現ベクターについては、フォワードプライマー（配列番号 1 4）及びリバースプライマー（配列番号 1 5）を用いて、実施例 1 で作製した p C R - B l u n t I I - g 2 9 0 0 を鋳型に g 2 9 0 0 配列として P C R で増幅した増幅断片を、p G L 3 ベクター（P r o m e g a 社）の N h e I / X h o I 部位に挿入することによって構築した。これを p G L 3 - g 2 9 0 0 とした。

図 6 に示す h s p 9 0 遺伝子プロモーターの部分配列である g 2 9 0 0 1 - 2、g 2 9 0 0 1 - 3、g 2 9 0 0 1 - 4、及び g 2 9 0 0 1 - 5 をそれぞれ挿入した外因性遺伝子発現ベクターについては、まず、g 2 9 0 0 の 5' 末端から 2 0 3 3 位に位置する X b a I 部位の上流領域（2 0 3 3 b p）を P C R で増幅した。具体的には、各部分断片に特異的なフォワードプライマー（g 2 9 0 0 1 - 2：配列番号 1 6、g 2 9 0 0 1 - 3：配列番号 1 7、g 2 9 0 0 1 - 4：配列番号 1 8、及び g 2 9 0 0 1 - 5：配列番号 1 9）と部分断片の全てに共通するリバースプライマー（配列番号 2 0）を用いた。それぞれの増幅産物を、p C R - B l u n t I I に挿入して、クローニングした領域の塩基配列をシーケンシングにより確認した。各プラスミドの X b a I 部位に p G L 3 - g 2 9 0 0 を X b a I で切断して得られた g 2 9 0 0 の 2 0 3 3 位以降を含む断片を挿入して、p C R - B l u n t I I - g 2 9 0 0 1 - 2、p C R - B l u n t I I - g 2 9 0 0 1 - 3、p C R - B l u n t I I - g 2 9 0 0 1 - 4、及び p C R - B l u n t I I - g 2 9 0 0 1 - 5 を得た。これらのプラスミドを N h e I / X h o I で切断して g 2 9 0 0 の部分配列を切り出し、p G L 3 に挿入することで p G L 3 - g 2 9 0 0 1 - 2、p G L 3 - g 2 9 0 0 1 - 3、p G L 3 - g 2 9 0 0 1 - 4、及び p G L 3 - g 2 9 0 0 1 - 5 を作製した。

#### （2）外因性遺伝子発現ベクターの精製

構築した外因性遺伝子発現ベクターは、実施例 1 と同様に H i S p e e d P l a s m i d M i d i K i t（キアゲン社）を用いて、添付のプロトコルに従い、精製した。さらに、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製して、0.5 mM リン酸バッファー（p H 7.0）/5 mM 塩化カリウムバッファーに溶解した。

#### （3）補正用ベクター

培養細胞への遺伝子導入効率を補正するために補正用ベクターとして、図 5 B に示すドクガ *O r g y i a p s e u d o t s u g a t a* の i m m e d i a t e - e a r l y 2（I E 2）遺伝子プロモーター下でウミシイタケルシフェラーゼ（R l u c）を発現するベクター p O p I E 2 - c o r e - R l u c（T a n a k a e t a l., 2012, *I n s e c t B i o c h e m M o l B i o l*, 42: 474 - 481）を用いた。

#### （4）カイコ培養細胞へのトランスフェクション

カイコの培養細胞には N I A S - B m - o y a n a g i 2 を使用した（農業生物資源研究所より入手）。1.6  $\mu$ l の F u g e n e（P r o m e g a 社）、0.1  $\mu$ g の各外因性遺伝子発現ベクター、及び 0.1  $\mu$ g の p O p I E 2 - c o r e - R l u c コントロールベクターを混合し、4.5  $\times 10^4$  の O y a n a g i 細胞に添加してトランスフェクションした。25℃で 72 時間インキュベートした後、5  $\times$  P a s s i v e L y s i s B u f f e r（P r o m e g a 社）により細胞を溶解し、-80℃で保存した。

#### （5）ルシフェラーゼ活性測定

ホタル及びウミシイタケのルシフェラーゼ活性測定には、d u a l - l u c i f e r a s e a s s a y s y s t e m（P r o m e g a 社）を用いた。（4）の細胞溶解液に L u c i f e r a s e A s s a y S u b s t r a t e を懸濁した L u c i f e r a s e A s s a y B u f f e r I I を加え、ルミノメーター（ニチオン社）によりホタルルシフェラーゼ（L u c）活性を測定した。その後、S t o p & G l o S u b s t r a t e を懸濁した S t o p & G l o B u f f e r を加えてウミシイタケルシフェラーゼ（R l u c）活性を測定した。得られたウミシイタケルシフェラーゼ活性に基づいて、それぞれの外因性遺伝子発現ベクターに由来するホタルルシフェラーゼ活性を補正して、各 h s p 9 0 部分断片のプロモーター活性を得た。

## (結果)

図7に結果を示す。g 2 9 0 0 1 - 2、g 2 9 0 0 1 - 3及びg 2 9 0 0 1 - 4では高いホタルルシフェラーゼが見られ、g 2 9 0 0と同等以上の強いプロモーター活性を有することが明らかとなった。また、これらのプロモーターの中では配列番号2で表されるg 2 9 0 0 1 - 3が最も強いプロモーター活性を有することも判明した。

一方、転写開始点から上流に1555bpの配列を有する配列番号5で表されるg 2 9 0 0 1 - 5では、プロモーター活性を有するものの、他の部分配列のプロモーター活性と比較して著しく低下することが明らかとなった。

以上の結果から、配列番号1で表され、カイコのh s p 9 0遺伝子の転写開始点から上流に1649bpのg 2 9 0 0 1 - 4が本発明の外因性遺伝子発現ベクターに必要とされるプロモーターとして必要かつ十分な活性を有することが判明した。

## &lt;実施例3：遺伝子プロモーターの活性比較&gt;

(目的)カイコh s p 9 0遺伝子プロモーターと従来頻用されていた遺伝子プロモーターとの発現誘導活性を比較する。

## (方法)

## (1)外因性遺伝子発現ベクターの構築及び精製

外因性遺伝子発現ベクターの構築及び精製の基本的な方法は、実施例1に記載の方法に従った。カイコのh s p 9 0遺伝子プロモーターにはg 2 9 0 0を用いた。また、陰性対照にはp G L 3ベクター(P r o m e g a社)を、さらに活性比較対照にはカイコの遺伝子組換えにおいて遺伝子プロモーターとして頻用されるアクチンA 3遺伝子プロモーター(B m A 3)を使用した。g 2 9 0 0を挿入した外因性遺伝子発現ベクターについては、実施例2で作製した「p G L 3 - g 2 9 0 0」を用いた。一方、B m A 3を挿入した外因性遺伝子発現ベクターp G L 3 - B m A 3については、以下のように作製した。まず、前記非特許文献1に記載されているp H A 3 P I Gベクターを鋳型として、5'末端にN h e I部位を配置したフォワードプライマー(C T A G C T A G C C C G G G C T C A A G C T T G A T G C G : 配列番号21)と、5'末端にX h o I部位を配置したリバースプライマー(C C G C T C G A G T G A A T T A G T C T G C A A G A A : 配列番号22)を用いてP C Rを行い、B m A 3プロモーター領域を増幅した。D N Aポリメラーゼには、K O D p l u s ( T O Y O B O社)を使用した。P C Rの反応条件は95 1分で熱変性後、95 30秒、60 30秒、68 1分を30サイクルで行った。次に、増幅産物をN h e I及びX h o Iで切断した後、得られた断片をp G L 3ベクターに挿入した。これをp G L 3 - B m A 3とした。

## (2)補正用ベクター

培養細胞への遺伝子導入効率を補正するための補正用ベクターには、実施例2に記載のp O p I E 2 - c o r e - R l u cを用いた。

## (3)カイコ培養細胞へのトランスフェクション

カイコ培養細胞へのトランスフェクションの具体的方法については実施例2に記載の方法に従った。

## (4)ルシフェラーゼ活性測定

ルシフェラーゼ活性の測定については、実施例2に記載の方法に準じた。

## (結果)

図8に結果を示す。本発明のカイコh s p 9 0遺伝子プロモーターに由来するg 2 9 0 0は、当該分野で従来一般的に用いられていたカイコA 3プロモーターの約20倍も高い活性を示し、極めて活性効率の高いプロモーターであることが明らかとなった。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0008】

本発明の外因性遺伝子発現ベクターによれば、それを昆虫細胞内に導入することで、胚から成虫に至る全ての発生ステージで、個体全身において目的の遺伝子の発現を強力に誘導することができる。

本発明の形質転換判別マーカーによれば、それを昆虫細胞内に導入することで、胚から

10

20

30

40

50

成虫に至る全ての発生ステージで、トランスジェニック昆虫を簡便に、効率的に、かつ正確に判別することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[ 配列表 ]

# SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences		
<120> Exogenous gene expression system, marker for identifying transformant and transformant		10
<130> PH-5922-PCT		
<150> JP 2013-168655		
<151> 2013-08-14		
<160> 22		20
<170> PatentIn version 3.5		
<210> 1		
<211> 1649		
<212> DNA		
<213> Bombyx mori		
<220>		
<223> hsp90 promoter g2900 delta 1-4		30
<400> 1		
ttatcgggcg agtagcgct cccaccacgc gtccatgctc actggctcac tgactaaaca	60	
agtccgaacc tgttgattag tcgagttcat tagtggcgct tctcaaattg aactttcgga	120	
cattcttaaa ctatcgaagt attctttggg atctcttcca atgetaattc ttccagaaga	180	
catttatctc ttcaatcgat ccattttcgt acctataact tatttttcat aatcacagaa	240	40
atttgctcgt ccaccttttc taaaatagcc attacgatta gcttaatcag tttattcact	300	
ctattgcgtt gcagtctgtt cactctgcaa aacaccactc acttgtgtac tctactggac	360	
cgtaatgcga acgattttctg tgcagtagcg agtagtttag ccactaaatt actcgggtact	420	
cgactaaaat actcgcctag tccgaacaag gctttagcga catattttacg taacgtatac	480	

accccgataa agagatttac tgtccaaaaa aaacgtcaaa aaatggaaca aattatgtgc	540	
tttttattta ttggtattac taatttcggt aagaatttca tcggaagcag ccagcgccga	600	
atgcggtgaa tagtaaaact ataagaagga agcggttgga atgatctggg taaaatgtta	660	
tttcttacga attacgatga ttctttgatt aaatttgga aagttttgtg gtcaaattat	720	
ttaacattca tcttgtatca ttatttgact ctaatttcaa ctaagttatt tctgtaatgt	780	10
taaaatttcg atgcttttct agaatatcca ggaatgttcc agatattctt gtgtgtagat	840	
cgtattgcc a ctttgtcca aatagcgcca ctaaaataat tcggcagagc tataacaacat	900	
ttggtaattt tatttatttt gctattttcc ccagtttttt aaattactgt gtttttaact	960	
agcaattaca tttaattgga tgcaatttac actgccttaa taattttttt ttagttgtaa	1020	20
tttggtttct tacgtttatg ctgtatattt ttagtgatct gcaaaatgcg aaacactgaa	1080	
cagcttagga aaatttaaaa tgtgagatgt ttcttttact taaataaata cttaaaatat	1140	
aacagagaaa aaacattttt aactagtcctg gcatatttta gtgaatctat tgatgaaaat	1200	
gaacgaaata tgtaattacc ttataattt cttgaattat tttaaggaaa tatatttttc	1260	
ctaacacttt aaacttcaaa gcgggtgatg caataataac taacacaaaa agaaacttgc	1320	30
agtgttaagt aaatgatttt tctcttcggt ttatggcctc ccaaaatgaa ataattgcc a	1380	
attaatttga aatgattaat tatttttatt taatattgtt tcggtttgta ttgatggtaa	1440	
aatgttgatg ctctctgacg gaaatagcgt cagaatcgag aaacttctac tgattcatag	1500	
atgtcgcttg ctagaggaaa gtataaaaac gaatttacac accgcgcccg gcgttatttg	1560	
aactaagaga agtacggaga ctaacgtttg atactttgcg ctttgaacaa cgtgtgttaa	1620	40
aaaccctcta gtcattttgt gtgaattaa	1649	



<210> 2  
 <211> 1884  
 <212> DNA  
 <213> Bombyx mori

<220>  
 <223> hsp90 promoter g2900 delta 1-3

<400> 2		10
cgcgcatcta atcgatacat agacattgat aaaaagaaat ccaatattaa gtattcaact	60	
gaatatacctt tataatcgcg ctataatcac ggtttatcta taaagccttg ttcggactag	120	
gcgagtattt tagtcgagta ccgagtaatt tagtagctaa atgtgtccga gcaccaaag	180	
tttagtcgag taggttagta aataatttag taaagccaat ccattttggt ctattttatc	240	
ggcgagtag cgctccccc caccggtcct agctcactgg ctactgact aaacaagtcc	300	20
gaacctgttg attagtcgag ttcatttagt gcgcttctca aatggaactt tcggacattc	360	
ttaaactatc gaagtattct ttgggatctc ttccaatgct aattctttca gaagacattt	420	
atctcttcaa tcgatccatt ttctgtaccta taacttattt ttcataatca cagaaatttg	480	
ctcgtccacc ttttctaaaa tagccattac gattagctta atcagtttat tcactctatt	540	
gogttgcagt ctgttcatcc tgcaaaacac cactcacttg tgtactctac tggaccgtaa	600	30
tgcgaacgat ttctgtgcag tagcgagtag tttagccact aaattactcg gtactcgact	660	
aaaatactcg cctagtccga acaaggcttt agcgacatat ttacgtaacg tatacacccc	720	
gataaagaga ttactgtcc aaaaaaacg tcaaaaaatg gaacaaatta tgtgcttttt	780	
atttattggt attactaatt tcgttaagaa tttcatcgga agcagccagc gccgaatgcg	840	40
gtgaatagta aaactataag aaggaagcgg ttggaatgat ctgggtaaaa tgttatttct	900	
tacgaattac gatgattcct tgattaaatt tggaaaagtt ttgtggtcaa attatttaac	960	

attcatcttg tatcatitat tgactctaatt ttcaactaag ttatttctgt aatgttaaaa	1020	
tttcgatgct tttctagaat attcaggaat gttccagata ttcttggtg tagatcgtat	1080	
tgccaccttg tgccaaatag cggcactaaa ataattcggc agagctatac aacatttggt	1140	
aattttatit attttgctat tttccccagt tttttaaatt actgtgtttt taactagcaa	1200	
ttacatttaa ttggatgcaa tttacactgc ctttaataatt ttttttagt tgtaatttgg	1260	10
tttcttacgt ttatgctgta ttttttagt gatctgcaaa atgcgaaaca ctgaacagct	1320	
taggaaaaatt taaaatgtga gatgtttctt ttacttaaatt aaatacttaa aatataacag	1380	
agaaaaaaca tttttaacta gtctggcata ttttagtgaa tctattgatg aaaatgaacg	1440	
aaatatgtaa ttacctttat aatttcttga attatittaa ggaaatatat ttttcctaac	1500	20
actttaaact tcaaagcggg tgatgcaata ataactaaca caaaaagaaa cttgcagtgt	1560	
taagtaaattg atttttctct tcgttttatg gcctcccaaa atgaaataat tgccaattaa	1620	
tttgaaatga ttaattatit ttatttaata ttgtttcggt ttgtattgat ggtaaaatgt	1680	
tgatgctctc tgacggaaat agcgtcagaa tcgagaaact tctactgatt catagatgtc	1740	
gcttgctaga ggaaagtata aaaacgaatt tacacaccgc gcccggcgtt atttgaacta	1800	30
agagaagtac ggagactaac gtttgatact ttgcgctttg aaacacgtgt gttaaaaacc	1860	
ctctagtcatt tttgtgtgaa ttaa	1884	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1969

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bombyx mori

40

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hsp90 promoter g2900 delta 1-2

&lt;400&gt; 3

tcgcgtttcc ttcactcgcg ttttcactat tcgcagatta aaatgtgtcc caattcctat	60	
tttcgcaatt aaagatctct ttattcgcgg atciaatcga tacatagaca ttgataaaaa	120	
gaaatccaat attaatgtatt caactgaata tcctttataa tcgcgctata atcacggttt	180	
atctataaag ccttggttcgg actaggcgag tattttagtc gactaccgag taatttagta	240	10
gctaaatgtg tccgagcacc aaaagttag tcgagtaggt tagtaaataa ttagtaaaag	300	
ccaatccatt ttgttctatt ttatcgggcg agtagcgct cccaccaacg gtcttagctc	360	
actggctcac tgactaaaca agtccgaacc tgttgattag tcgagttcat tagtggcgct	420	
tctcaaatgg aactttcgga cattcttaaa ctatcgaagt attctttggg atctcttcca	480	
atgctaattc tttcagaaga catttatctc ttcaatcgat ccattttcgt acctataact	540	20
tatttttcat aatcacagaa atttgctcgt ccacctttc taaaatagcc attacgatta	600	
gcttaatcag ttatttact ctattgcgtt gcagtctgtt catcctgcaa aacaccactc	660	
acttgtgtac tctactggac cgtaatgcga acgatttctg tgcagtagcg agtagtttag	720	
ccactaaatt actcggtact cgactaaaat actcgcttag tccgaacaag gctttagcga	780	
catatttaag taacgtatac accccgataa agagatttac tgtccaaaaa aaacgtcaaa	840	30
aaatggaaca aattatgtgc tttttattta ttggtattac taatttcgtt aagaatttca	900	
tcggaagcag ccagcgccga atgcggtgaa tagtaaaact ataagaagga agcggttgga	960	
atgatctggg taaaatgtta ttctttacga attacgatga ttctttgatt aaatttgga	1020	
aagttttgtg gtcaaattat ttaacattca tcttgatca tttattgact ctaatttcaa	1080	40
ctaagttatt tctgtaatgt taaaatttcg atgcttttct agaataattca ggaatgttcc	1140	
agatattctt gtgtgtagat cgtattgcc ccttgigcca aatagcggca ctaaaataat	1200	

tcggcagagc tataacaacat ttggtaattt tatttatattt gctattttcc ccagtttttt	1260
aaattactgt gtttttaact agcaattaca ttttaattgga tgcaatttac actgccttaa	1320
taattttttt ttagttgtaa ttgggtttct tacgtttatg ctgtatattt ttagtgatct	1380
gcaaaatgcg aaacactgaa cagcttagga aaatttaaaa tgtgagatgt ttcttttact	1440
taaataaata cttaaaatat aacagagaaa aaacattttt aactagtctg gcataattta	1500
gtgaatctat tgatgaaaat gaacgaaata tgtaattacc ttataattt cttgaattat	1560
tttaaggaaa tatatttttc ctaacacttt aaacttcaaa gcgggtgatg caataataac	1620
taacacaaaa agaaacttgc agtgtaagt aaatgatttt tctcttcggt ttatggcctc	1680
ccaaaatgaa ataattgcc aattaattga aatgattaat tatttttatt taatattgtt	1740
tcggtttgta ttgatggtaa aatgttgatg ctctctgacg gaaatagcgt cagaatcgag	1800
aaacttctac tgattcatag atgtcgcttg ctagaggaaa gtataaaaac gaatttacac	1860
accgcgcccc gcgttatttg aactaagaga agtacggaga ctaacgtttg atactttgcg	1920
ctttgaaaca cgtgtgttaa aaacctctta gtcattttgt gtgaattaa	1969

10

20

<210> 4  
 <211> 2884  
 <212> DNA  
 <213> Bombyx mori

30

<220>  
 <223> hsp90 promoter g2900

<400> 4	
ccatggetca gttegtttta aatatcgata gtctttaaaa aaaaattatg atgtgaaatc	60
tgaaaagggtt tgcgcactat gcgctcatgc aatttcaact ttaatcaata gccctaaagc	120
agtgctgcc acaataaaaa aaatatattat tgtaagtgag ataactaaat ttgtcagaat	180

40

tcacgccttc tttgctatct tttattatgg tttgtgttta attatatctt aaacgtgttg	240	
atgaaatagt aagataatta gcattaaatt tacaccactt tcgtgaaggt tttctggcta	300	
atcgtttcag tttgtgtggc ataaaactat gggctataac tattgctggg gagactttta	360	
cagcttcata aggacgggtg gattaactca aaaacacagc ttggagggaa agagtttgct	420	
aatagccgcc agagtgcctc caaaaggggt ttaatagtac taggacagtt actttacgag	480	10
tgcactact ccgtgtcgag aagcttagag ctgagtatca catacaaac gtcgacgagt	540	
tagctgaacc atgcttttat tgctcttggc gttaaaatta gtagtgataa tgagaacgta	600	
tcagggtgat ctgacattat ttgaaagatg agactaaaga tctgtaggtt gtgcgagaga	660	
atgtcgcgag gcaaaaatag tttcctctac ctgtagataa cgagaacaca aattttatac	720	
agggtgtata ggagaagacg aggaacaatt attttaatga tttctgacat ctaaataaac	780	20
aataagattt tacttttgat gaacaaaaca agtaactcac atcttaaact gaacgttact	840	
acgttctggg ttgctattgt aattttaatc aatgttttct ccaatctgca ttatgataca	900	
ataaaagctc attattcgcg tttccttcac tcgcgttttc actattcgca gattaaaatg	960	
tgtcccaatt cctattttcg caattaaaga tctctttatt cgcggatcta atcgatacat	1020	30
agacattgat aaaaagaaat ccaatattaa gtattcaact gaatatcctt tataatcgcg	1080	
ctataatcac ggtttatcta taaagccttg ttcggactag gcgagtattt tagtcgagta	1140	
ccgagtaatt tagtagctaa atgtgtccga gcaccaaag tttagtcgag taggttagta	1200	
aataatttag taaagccaat ccattttggt ctattttatc gggcgagtag cgcctccac	1260	
cacgcgtcct agctcactgg ctactgact aaacaagtcc gaacctgttg attagtcgag	1320	40
ttcattagtg gcgcttctca aatggaactt tcggacattc ttaaactatc gaagtattct	1380	

ttgggatctc ttccaatgct aattctttca gaagacattt atctcttcaa tegatccatt	1440	
ttcgtaccta taacttattt ttcataatca cagaaatttg ctcgtccacc ttttctaaaa	1500	
tagccattac gattagctta atcagtttat tcaactctatt gcgttgcagt ctgttcatcc	1560	
tgcaaaacac cactcacttg tgtactctac tggaccgtaa tgcgaacgat ttctgtgcag	1620	
tagcgagtag tttagccact aaattactcg gtactcgact aaaatactcg cctagtccga	1680	10
acaaggcttt agcgacatat ttacgtaacg tatacacccc gataaagaga tttactgtcc	1740	
aaaaaaaaacg tcaaaaaatg gaacaaatta tgtgcttttt atttatttgt attactaatt	1800	
tcgttaagaa tttcatcgga agcagccagc gccgaatgcg gtgaatagta aaactataag	1860	
aaggaagcgg ttggaatgat ctgggtaaaa tgttatttct tacgaattac gatgattctt	1920	20
tgattaaatt tggaaaagtt ttgtggtcaa attatttaac attcatcttg tatcatttat	1980	
tgactctaatt ttcaactaag ttatttctgt aatgttaaaa ttccgatgct tttctagaat	2040	
attcaggaat gttccagata ttcttgtgtg tagatcgtat tgccaccttg tgccaaatag	2100	
cggcactaaa ataattcggc agagctatac aacatttggt aattttattt attttgctat	2160	
tttccccagt tttttaaatt actgtgtttt taactagcaa ttacatttaa ttggatgcaa	2220	30
tttacactgc ctttaataatt tttttttagt tgtaatttgg tttcttacgt ttatgctgta	2280	
tatttttagt gatctgcaaa atgcgaaaca ctgaacagct taggaaaatt taaaatgtga	2340	
gatgtttctt ttacttaaat aaatacttaa aatataacag agaaaaaaca tttttaacta	2400	
gtctggcata ttttagtgaa tctattgatg aaaatgaacg aaatatgtaa ttacctttat	2460	
aatttcttga attattttta ggaaatatat ttttctaac acttttaaact tcaaagcggg	2520	40
tgatgcaata ataactaaca caaaaagaaa cttgcagtgt taagtaaag atttttctct	2580	
tcgttttatg gcctcccaaa atgaaataat tgccaattaa ttgaaatga ttaattattt	2640	

ttatttaata ttgtttcggg ttgtattgat ggtaaaatgt tgatgctctc tgacggaaat	2700	
agcgtcagaa tcgagaaact tctactgatt catagatgtc gcttgctaga ggaaagtata	2760	
aaaacgaatt tacacaccgc gcccggcgtt atttgaacta agagaagtac ggagactaac	2820	
gtttgatact ttgcgctttg aaacacgtgt gttaaaaacc ctctagtcac tttgtgtgaa	2880	
ttaa	2884	10
<210> 5		
<211> 1555		
<212> DNA		
<213> Bombyx mori		
<220>		
<223> hsp90 promoter g2900 delta 1-5		20
<400> 5		
ggcgcttctc aaatggaact ttccgacatt cttaactat cgaagtattc tttgggatct	60	
cttccaatgc taattcttcc agaagacatt tatctcttca atcgatccat tttcgtaacct	120	
ataacttatt tttcataatc acagaaattt gctcgccac cttttctaaa atagccatta	180	
cgattagctt aatcagttta ttactctat tgcgttcag tctgttcac ctgcaaaaca	240	30
ccactcactt gtgtactcta ctggaccgta atgcgaacga tttctgtgca gtagcgagta	300	
gtttagccac taaattactc ggtactcgac taaaatactc gcctagtcgc aacaaggctt	360	
tagcgacata tttacgtaac gtatacacc cgataaagag atttactgtc caaaaaaac	420	
gtcaaaaaat ggaacaaatt atgtgctttt tatatttgg tattactaat ttcgttaaga	480	
atttcacgg aagcagccag cgccgaatgc ggtgaatagt aaactataa gaaggaagcg	540	40
gttggaatga tctgggtaaa atgttatctt ttacgaatta cgatgattct ttgattaat	600	

ttggaaaagt ttgtgtgtca aattatttaa cattcatctt gtatcattta ttgactctaa	660	
tttcaactaa gttattttctg taatgttaaa atttcgatgc ttttctagaa tattcaggaa	720	
tgttccagat attcttgtgt gtagatcgta ttgccacctt gtgccaaata gcggcactaa	780	
aataattcgg cagagctata caacatttgg taattttatt tattttgcta ttttcccag	840	
ttttttaaat tactgtgttt ttaactagca attacattta attggatgca atttacactg	900	10
ccttaataat ttttttttag ttgtaatttg gtttcttacg tttatgctgt atatttttag	960	
tgatctgcaa aatgcgaaac actgaacagc ttaggaaaat ttaaaatgtg agatgtttct	1020	
tttacttaaa taaatactta aaatataaca gagaaaaaac atttttaact agtctggcat	1080	
attttagtga atctattgat gaaaatgaac gaaatatgta attaccttta taatttcttg	1140	20
aattatttta aggaaatata tttttcctaa cactttaaac ttcaaagcgg gtgatgcaat	1200	
aataactaac acaaaaagaa acttgcagtg ttaagtaaat gatttttctc ttcgttttat	1260	
ggcctcccaa aatgaaataa ttgccaattia atttgaaatg attaattatt tttatttaat	1320	
attgtttcgg tttgtattga tggtaaaatg ttgatgctct ctgacggaaa tagcgtcaga	1380	
atcgagaaac ttctactgat tcatagatgt cgcttgctag aggaaagtat aaaaacgaat	1440	30
ttacacaccg cgcccggtgt tatttgaact aagagaagta cggagactaa cgtttgatac	1500	
tttgcgcttt gaaacacgtg tggtaaaaac cctctagtca ttttgtgtga attaa	1555	

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bombyx mori

40

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; signal peptide of serisin 1 from Bombyx mori



<400> 6

Met Arg Phe Val Leu Cys Cys Thr Leu Ile Ala Leu Ala Ala Leu Ser  
1 5 10 15

Val Lys Ala

10

<210> 7

<211> 57

<212> DNA

<213> Bombyx mori

<220>

<223> nucleic acid sequence coding signal peptide of serisin 1 from  
Bombyx mori

20

<400> 7

atgcgtttcg ttctgtgctg cactttgatt gcgttgctg cgctcagcgt aaaagct 57

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Bombyx mori

30

<220>

<223> signal peptide of serisin 2 from Bombyx mori

<400> 8

Met Lys Ile Pro Tyr Val Leu Leu Phe Leu Val Gly Val Ala Val Val  
1 5 10 15

40

Asn Ala

<210> 9  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Bombyx mori

<220>  
<223> nucleic acid sequence coding signal peptide of serisin 2 from  
Bombyx mori

10

<400> 9  
atgaagatcc catacgtctt gctgttcctt gtgggcgtgg ctgtgggtcaa cgca 54

<210> 10  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Bombyx mori

20

<220>  
<223> signal peptide of serisin 3 from Bombyx mori

<400> 10

Met Asn Cys Lys Val Ala Leu Phe Leu Ile Val Ala Ile Val Ala Val  
1 5 10 15

Gln Ala

30

<210> 11  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Bombyx mori

<220>  
<223> nucleic acid sequence coding signal peptide of serisin 3 from  
Bombyx mori

40

<400> 11

atgaattgta aagttgctct attcctgata gtggetattg tagccgtcca ggct 54

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10

<223> primer

<400> 12

ccatggctca gttagcttta aata 24

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

20

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 13

ttaattcaca caaatgact agaggg 26

<210> 14

30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 14

ctagctagcc catggctcag ttcgctt 27 40

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 15

ccgctcgagt taattcacac aaaatgac

28

10

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

20

<400> 16

gctagctcgc gtttccttca ctcgcg

26

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> primer

<400> 17

gctagccgcg gatctaatacg atacatagac

30

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> primer

<400> 18		
gctagcttat cgggcgagta ggcct	26	
<210> 19		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial		10
<220>		
<223> primer		
<400> 19		
gctagcggcg cttctcaaatt ggaactttcg	30	
<210> 20		
<211> 33		20
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 20		
tctagaaaag catcgaaatt ttaacattac aga	33	
		30
<210> 21		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 21		40
ctagctagcc cgggctcaag cttgatgcg	29	

<210> 22  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial

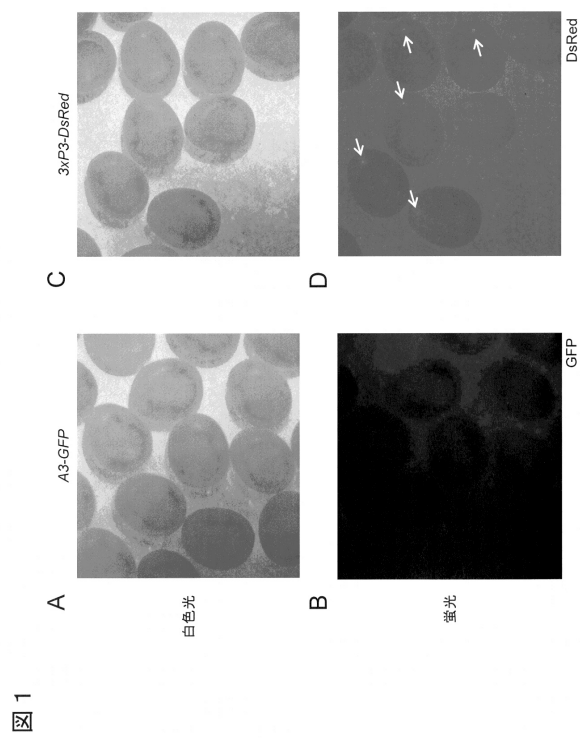
<220>  
<223> primer

<400> 22  
ccgctcgagt gaattagtct gcaagaa

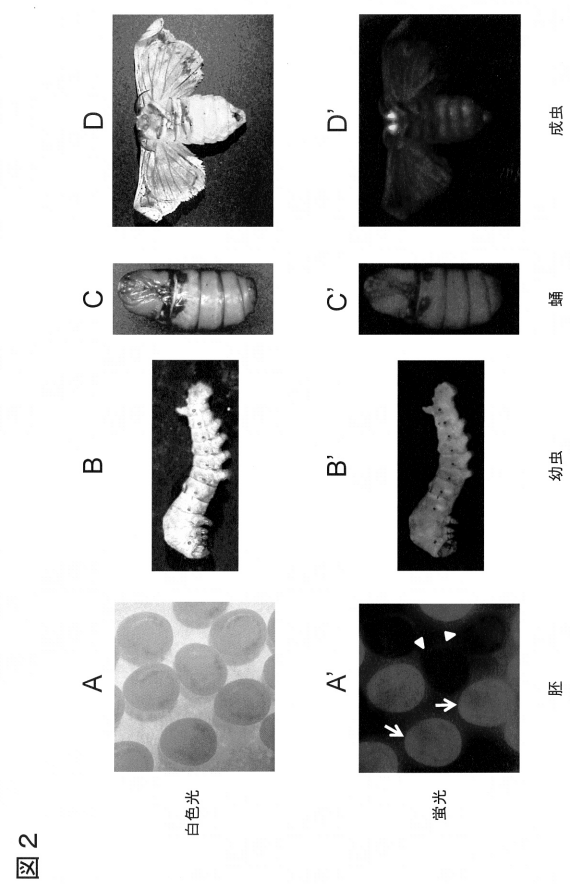
10

27

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

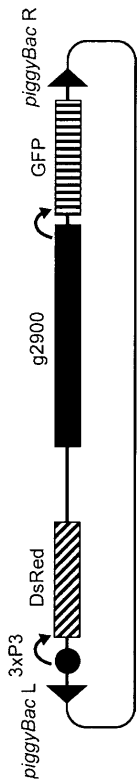
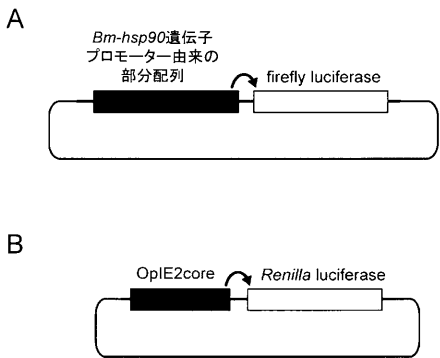


図 3

【 図 5 】

図 5



【 図 4 】

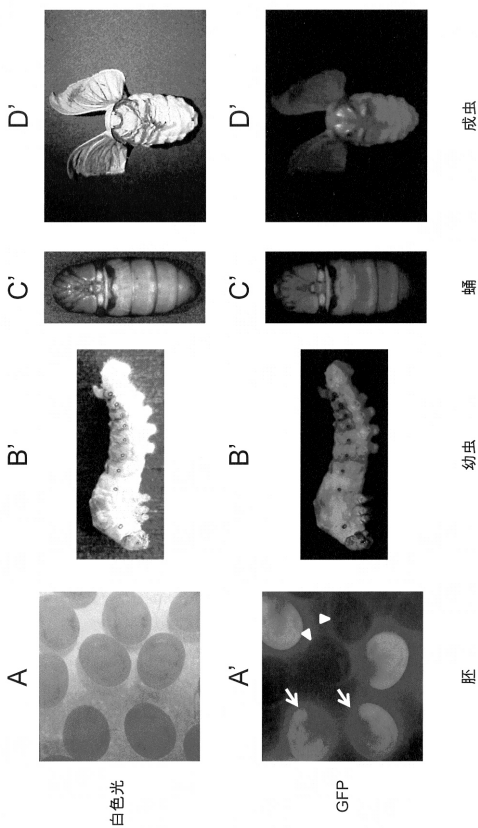
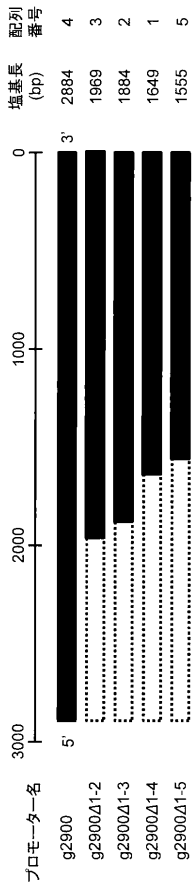


図 4

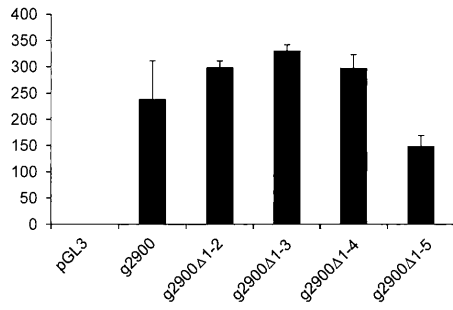
【 図 6 】

図 6



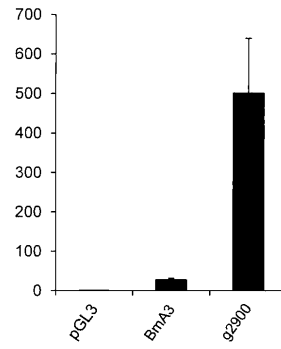
【図 7】

図 7



【図 8】

図 8





---

 フロントページの続き

- (72)発明者 内野 恵郎  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 国立研究開発法人農業生物資源研究所内
- (72)発明者 瀬筒 秀樹  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 国立研究開発法人農業生物資源研究所内
- (72)発明者 田中 博光  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 国立研究開発法人農業生物資源研究所内

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 MASUMOTO M., et al., A Baculovirus Immediate-Early Gene, ie1, Promoter Drives Efficient Expression of a Transgene in Both, PLOS ONE, 2012年11月, Vol. 7, No. 11, e49323(P. 1-10)
- SOSALEGOWDA A. H., et al., Molecular characterization of heat shock proteins 90 (HSP83?) and 70 in tropical strains of Bombyx m, Proteomics, 2010年, Vol. 10, P. 2734-2745
- SHIMOMURA M., et al., KAIKObase: An integrated silkworm genome database and data mining tool, BMC Genomics, 2009年10月, Vol. 10, No. 486, doi:10.1186/1471-2164-10-486 (P. 1-8)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
C12N 5/10  
C12Q 1/68 - 1/6897  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
P u b M e d  
D W P I ( D e r w e n t I n n o v a t i o n )