

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年2月23日(2012.2.23)

【公表番号】特表2011-509081(P2011-509081A)

【公表日】平成23年3月24日(2011.3.24)

【年通号数】公開・登録公報2011-012

【出願番号】特願2010-541103(P2010-541103)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 0 1 H 5/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 5/00 1 0 3

A 0 1 H 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成24年1月6日(2012.1.6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) コモウイルス科(Comoviridae)の 2 分節 RNA ウイルスの RNA - 2 ゲノムセグメント由来の発現エンハンサー配列であって、前記 RNA - 2 ゲノムセグメントの開始部位が変異され、

前記コモウイルス科(Comoviridae)のウイルスの前記 RNA - 2 ゲノムセグメントは、同じトリプレットリーディングフレームに位置する 2 つの異なる翻訳開始部位を介して 2 つのカルボキシ共末端タンパク質をコードし、

変異された前記開始部位は、前記 2 つの開始部位のうちの第 1 であり、ササゲモザイクウイルス(CPMV)の野生型 RNA - 2 セグメントの 161 位の開始部位に相当する、
発現エンハンサー配列と、

(b) 目的のタンパク質をコードする遺伝子の、遺伝子発現系への挿入を促進するための異種配列であって、前記エンハンサー配列内の変異された前記開始部位の下流に位置する異種配列と、必要に応じて

(c) 3'UTRと、
を含む、遺伝子発現構築物を含む、遺伝子発現系。

【請求項 2】

(a) コモウイルス科(Comoviridae)の 2 分節 RNA ウイルスの RNA - 2 ゲノムセグメント由来の発現エンハンサー配列であって、前記 RNA - 2 ゲノムセグメントの開始部位が変異され、

前記コモウイルス科(Comoviridae)のウイルスの前記 RNA - 2 ゲノムセグメントは、同じトリプレットリーディングフレームに位置する 2 つの異なる翻訳開始部位を介して 2 つのカルボキシ共末端タンパク質をコードし、

変異された前記開始部位は、前記 2 つの開始部位のうちの第 1 であり、ササゲモザイク

ウイルス（ＣＰＭＶ）の野生型ＲＮＡ－２セグメントの１６１位の開始部位に相当する、
発現エンハンサー配列と、

（ｂ）目的のタンパク質をコードする遺伝子であって、前記目的のタンパク質をコードする遺伝子は、前記エンハンサー配列の下流に位置し、前記目的のタンパク質をコードする遺伝子は、プロモーターおよび終結配列に作動可能に連結される、目的のタンパク質をコードする遺伝子と、
を含む、遺伝子発現系。

【請求項３】

３' ＵＴＲを含むか、またはさらに含み、前記３' ＵＴＲは必要に応じて、同じ２分節ＲＮＡウイルス由来である、請求項２に記載の遺伝子発現系。

【請求項４】

前記２分節ＲＮＡウイルスがコモウイルスである、請求項２ または３に記載の遺伝子発現系。

【請求項５】

前記コモウイルスが（ＣＰＭＶ）である、請求項４に記載の遺伝子発現系。

【請求項６】

前記エンハンサー配列が、変異された前記開始部位を有するコモウイルスＲＮＡ－２ゲノムセグメント配列の少なくともヌクレオチド１０～５１２、２０～５１２、３０～５１２、４０～５１２、５０～５１２、１００～５１２、１５０～５１２、１～５１４、１０～５１４、２０～５１４、３０～５１４、４０～５１４、５０～５１４、１００～５１４、１５０～５１４、１～５１１、１０～５１１、２０～５１１、３０～５１１、４０～５１１、５０～５１１、１００～５１１、１５０～５１１、１～５０９、１０～５０９、２０～５０９、３０～５０９、４０～５０９、５０～５０９、１００～５０９、１５０～５０９、１～５０７、１０～５０７、２０～５０７、３０～５０７、４０～５０７、５０～５０７、１００～５０７、または１５０～５０７を含む、請求項４または請求項５に記載の遺伝子発現系。

【請求項７】

前記エンハンサー配列が、表１に示されるＣＰＭＶ ＲＮＡ－２ゲノムセグメント配列のヌクレオチド１０～５１２、２０～５１２、３０～５１２、４０～５１２、５０～５１２、１００～５１２、１５０～５１２、１～５１４、１０～５１４、２０～５１４、３０～５１４、４０～５１４、５０～５１４、１００～５１４、１５０～５１４、１～５１１、１０～５１１、２０～５１１、３０～５１１、４０～５１１、５０～５１１、１００～５１１、１５０～５１１、１～５０９、１０～５０９、２０～５０９、３０～５０９、４０～５０９、５０～５０９、１００～５０９、１５０～５０９、１～５０７、１０～５０７、２０～５０７、３０～５０７、４０～５０７、５０～５０７、１００～５０７、または１５０～５０７を含み、野生型ＣＰＭＶ ＲＮＡ－２ゲノム配列の１６１位の開始部位が変異されている、請求項６に記載の遺伝子発現系。

【請求項８】

前記エンハンサー配列が、表１に示されるＣＰＭＶ ＲＮＡ－２ゲノムセグメント配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％または５０％の同一性を有し、野生型ＣＰＭＶ ＲＮＡ－２ゲノムセグメントの１６１位の開始部位が変異されている、請求項４または請求項５に記載の遺伝子発現系。

【請求項９】

（ａ）プロモーターと、

（ｂ）１６１位のＡＵＧが表２に示されるように変異され、前記プロモーターの下流に位置する、表１に示されるササゲモザイクウイルスＲＮＡ－２ゲノムセグメント配列のヌクレオチド１～５０７と、

（ｃ）（ｂ）に規定される配列の下流に位置する目的のタンパク質をコードする遺伝子と、

(d) 表 1 に示され、前記目的のタンパク質をコードする遺伝子の下流に位置する、ササゲモザイクウイルス RNA - 2 ゲノムセグメント配列のヌクレオチド 3 3 0 2 ~ 3 4 8 1 と、

(e) (d) に規定される配列の下流に位置するノパリン合成ターミネーターと、を含むか、または

(a) プロモーターと、

(b) 表 1 に示されるササゲモザイクウイルス RNA - 2 ゲノムセグメント配列のヌクレオチド 1 ~ 5 0 7 と少なくとも 7 0 % の同一性を有する発現エンハンサー配列であって、1 6 1 位の A U G は変異され、前記プロモーターの下流に位置する、発現エンハンサー配列と、

(c) (b) に規定される配列の下流に位置する目的のタンパク質をコードする遺伝子と、

(d) 表 1 に示され、前記目的のタンパク質をコードする遺伝子の下流に位置する、ササゲモザイクウイルス RNA - 2 ゲノムセグメント配列のヌクレオチド 3 3 0 2 ~ 3 4 8 1 と、

(e) (d) に規定される配列の下流に位置するノパリン合成ターミネーターと、を含む、遺伝子発現系。

【請求項 1 0】

(a) プロモーターおよび終結配列に作動可能に連結された目的の異種タンパク質をコードする少なくとも 1 つの外來性遺伝子を保有する コモウイルス科 (Comoviridae) の 2 分節ウイルスゲノムの切断された RNA - 2 由来の配列を含む第 1 の遺伝子構築物であって、前記遺伝子構築物は前記外來性遺伝子の上流に変異された開始部位を含み、

前記コモウイルス科 (Comoviridae) のウイルスの前記 RNA - 2 ゲノムセグメントは、同じトリプレットリーディングフレームに位置する 2 つの異なる翻訳開始部位を介して 2 つのカルボキシ共末端タンパク質をコードし、

変異された前記開始部位は、前記 2 つの開始部位のうちの第 1 であり、CPMV の野生型 RNA - 2 セグメントの 1 6 1 位の開始部位に相当する、第 1 の遺伝子構築物と、必要に応じて、

(b) プロモーターおよび終結配列に作動可能に連結された遺伝子サイレンシングの抑制因子を含む、前記第 1 の遺伝子構築物内に必要に応じて組み込まれる第 2 の遺伝子構築物と、

を含む、遺伝子発現系。

【請求項 1 1】

前記 2 分節 RNA ウイルスは CPMV であり、1 1 5 位の A U G も変異される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の遺伝子発現系。

【請求項 1 2】

DNA バイナリーベクターである、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の遺伝子発現系。

【請求項 1 3】

コモウイルス科 (Comoviridae) の 2 分節 RNA ウイルスの RNA - 2 ゲノムセグメント由来の配列の発現または翻訳を増強する活性を増加させるためのプロセスであって、前記配列内の開始部位を変異させることを含み、

前記コモウイルス科 (Comoviridae) のウイルスの前記 RNA - 2 ゲノムセグメントは、同じトリプレットリーディングフレームに位置する 2 つの異なる翻訳開始部位を介して 2 つのカルボキシ共末端タンパク質をコードし、

変異された前記開始部位は、前記 2 つの開始部位のうちの第 1 であり、CPMV の野生型 RNA - 2 セグメントの 1 6 1 位の開始部位に相当する、プロセス。

【請求項 1 4】

前記 2 分節 RNA ウイルスが、必要に応じてササゲモザイクウイルスである、コモウ

ルスである、請求項 13 に記載のプロセス。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の遺伝子発現系を用いて、宿主生物内で目的のタンパク質を発現させるための方法。

【請求項 16】

前記宿主生物は真核性宿主であり、前記真核性宿主は植物または昆虫である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

コモウイルス科 (Comoviridae) の 2 分節ウイルスの RNA 2 ゲノムセグメント由来の配列に作動可能に連結される、目的の異種タンパク質をコードする遺伝子またはオープンリーディングフレーム (ORF) から前記目的の異種タンパク質の翻訳を増強する方法であって、

前記コモウイルス科 (Comoviridae) のウイルスの前記 RNA 2 ゲノムセグメントは、同じトリプレットリーディングフレームに位置する 2 つの異なる翻訳開始部位を介して 2 つのカルボキシ共末端タンパク質をコードし、

前記 RNA 2 由来の配列内の 2 つの開始部位のうちの第 1 を変異させることを含み、変異された前記開始部位は、CPMV の野生型 RNA - 2 セグメントの 161 位の開始部位に相当する、方法。

【請求項 18】

以下の工程：

(a) プロモーターおよび終結配列に作動可能に連結された目的の異種タンパク質をコードする少なくとも 1 つの外來性遺伝子を保有するコモウイルス科 (Comoviridae) の 2 分節ウイルスゲノムの切断された RNA - 2 由来の配列を含む第 1 の遺伝子構築物を含む遺伝子発現構築物を導入する工程であって、

前記遺伝子構築物は、植物細胞内に前記外來性遺伝子の upstream に変異された開始部位を含み、

前記コモウイルス科 (Comoviridae) のウイルスの前記 RNA - 2 ゲノムセグメントは、同じトリプレットリーディングフレームに位置する 2 つの異なる翻訳開始部位を介して 2 つのカルボキシ共末端タンパク質をコードし、

変異された前記開始部位は、前記 2 つの開始部位のうちの第 1 であり、CPMV の野生型 RNA - 2 セグメントの 161 位の開始部位に相当する、工程と、必要に応じて、

(b) 植物細胞内にプロモーターおよび終結配列に作動可能に連結された遺伝子サイレンシングの抑制因子を含む、前記第 1 の遺伝子構築物内に必要に応じて組み込まれる第 2 の遺伝子構築物を導入する工程と、
を含む、植物においてタンパク質を発現させる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の遺伝子発現系を宿主細胞に導入することによって得たか、または得られる宿主生物であって、目的のタンパク質をコードする遺伝子が、向上したレベルで発現される、宿主生物。

【請求項 20】

請求項 2 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の遺伝子発現系で一過性または安定にトランスフェクトされる宿主生物。

【請求項 21】

前記宿主生物は植物または植物細胞である、請求項 19 または 20 に記載の宿主生物。

【請求項 22】

請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の宿主生物を使用することと、必要に応じて、目的のタンパク質が発現される組織を収集することと、前記組織から前記目的のタンパク質を単離することと、を含む、目的のタンパク質を産生するための方法。