

【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 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 P 21/02 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

A 01 H 5/00 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 P 21/02 C

C 12 N 5/00 1 0 3

A 01 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 ウィルス由来である、請求項 2 に記載の遺伝子発現系。

【請求項 4】

前記 2 分節 RNA ウィ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ィルス 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3302～3481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1～507と少なくとも70%の同一性を有する発現エンハンサー配列であって、161位のAUG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3302～3481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10】

(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つの外来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来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161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11】

前記2分節RNAウイルスはCPMVであり、115位のAUGも変異される、請求項1～10のいずれか一項に記載の遺伝子発現系。

#### 【請求項12】

DNAバイナリーベクターである、請求項1～11のいずれか一項に記載の遺伝子発現系。

#### 【請求項13】

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161位の開始部位に相当する、プロセス。

#### 【請求項14】

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、コモウイ

ルスである、請求項1\_3に記載のプロセス。

【請求項15】

請求項1\_1\_2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1\_5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RNA2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RNA2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RNA2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つの外来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来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2~1\_2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1\_9または2\_0に記載の宿主生物。

【請求項22】

請求項1\_9~2\_1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。