

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02008/117811

発行日 平成22年7月15日 (2010. 7. 15)

(43) 国際公開日 平成20年10月2日 (2008. 10. 2)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|------------|-------------------|
| AO1H 5/00 (2006.01) | AO1H 5/00 | Z N A A 2 B O 3 O |
| C12N 5/10 (2006.01) | C12N 5/00 | C 4 B O 2 4 |
| C12P 21/00 (2006.01) | C12P 21/00 | C 4 B O 6 4 |
| C12N 15/09 (2006.01) | C12N 15/00 | A 4 B O 6 5 |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 26 頁)

| | |
|---|---|
| 出願番号 特願2009-506352 (P2009-506352) | (71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2008/055637 | (74) 代理人 110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所 |
| (22) 国際出願日 平成20年3月26日 (2008. 3. 26) | (72) 発明者 森 正之 日本国石川県石川郡野々市町粟田6-107 |
| (31) 優先権主張番号 特願2007-82289 (P2007-82289) | (72) 発明者 土肥 浩二 日本国大阪府羽曳野市島泉9-13-22 |
| (32) 優先日 平成19年3月27日 (2007. 3. 27) | Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD08 CA17 CB02 CD05 CD12 |
| (33) 優先権主張国 日本国(JP) | |

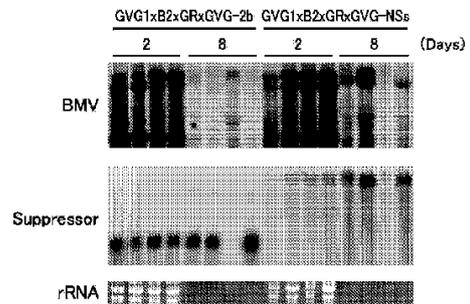
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換植物、形質転換細胞、タンパク質生産キットおよびタンパク質の生産方法

(57) 【要約】

タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサプレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換植物であって、上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、ウイルスの複製酵素をコードするポリヌクレオチドの少なくとも一つ、および上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備える。これにより、サイレンシングサプレッサーを有さない植物RNAウイルスベクターを用いた増幅系においても、サイレンシングおよび生育異常を起こすことなく、効率的に外来タンパク質を生産可能な形質転換植物、形質転換細胞、タンパク質生産キットおよびタンパク質の生産方法を提供する。

【図2】



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換植物であって、

上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、

上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであることを特徴とする植物。

10

【請求項 2】

上記植物RNAウイルスがブロムモザイクウイルスであることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の植物。

【請求項 3】

上記プロモーターが、ステロイドホルモンによって誘導されることを特徴とする請求の範囲第1項または第2項に記載の植物。

【請求項 4】

上記ステロイドホルモンはデキサメタゾンであることを特徴とする請求の範囲第3項に記載の植物。

【請求項 5】

上記植物は、マメ科、セリ科、アブラナ科、ウリ科、ナス科およびイネ科よりなる群より選ばれる科に属することを特徴とする請求の範囲第1項から第4項のいずれか1項に記載の植物。

20

【請求項 6】

上記植物はベンサミアーナ植物であることを特徴とする請求の範囲第5項に記載の植物。

【請求項 7】

発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換細胞であって、

上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、

上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであることを特徴とする形質転換細胞。

30

【請求項 8】

上記植物RNAウイルスがブロムモザイクウイルスであることを特徴とする請求の範囲第7項に記載の形質転換細胞。

【請求項 9】

上記プロモーターが、ステロイドホルモンによって誘導されることを特徴とする請求の範囲第7項または第8項に記載の形質転換細胞。

40

【請求項 10】

上記ステロイドホルモンはデキサメタゾンであることを特徴とする請求の範囲第9項に記載の形質転換細胞。

【請求項 11】

発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを少なくとも含むタンパク質生産キットであって、

上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つ

50

は、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、

上記NSタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであることを特徴とするタンパク質生産キット

【請求項12】

上記植物RNAウイルスがブロムモザイクウイルスであることを特徴とする請求の範囲第11項に記載のタンパク質生産キット。

【請求項13】

上記タンパク質生産キットであって、さらに、ステロイドホルモンを含むことを特徴とする請求の範囲第11項または第12項に記載のタンパク質生産キット。

【請求項14】

上記ステロイドホルモンはデキサメタゾンであることを特徴とする請求の範囲第13項に記載のタンパク質生産キット。

【請求項15】

発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターをコードするポリヌクレオチドを植物に導入する工程と、

NSタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物に導入する工程と、

上記植物を転写誘導する工程と、を少なくとも含むタンパク質の生産方法であって、

上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備え、

上記NSタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に、発現誘導型のプロモーターを備えることを特徴とするタンパク質の生産方法。

【請求項16】

上記植物RNAウイルスがブロムモザイクウイルスであることを特徴とする請求の範囲第15項に記載のタンパク質の生産方法。

【請求項17】

上記転写誘導はステロイドホルモンによって行われることを特徴とする請求の範囲第15項または第16項に記載のタンパク質の生産方法。

【請求項18】

上記植物は、マメ科、セリ科、アブラナ科、ウリ科、ナス科およびイネ科よりなる群より選ばれる科に属することを特徴とする請求の範囲第15項から第17項のいずれか1項に記載のタンパク質の生産方法。

【請求項19】

上記植物は、ベンサムアーナ植物であることを特徴とする請求の範囲第18項に記載のタンパク質の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、形質転換植物、形質転換細胞、タンパク質生産キットおよびタンパク質の生産方法に関するものであり、より具体的には、通常はサイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドの発現を抑制しておき、ウイルスベクターの誘導発現が行われている場合に、上記ポリヌクレオチドを誘導発現させることができるため、生育阻害を起こすことなくサイレンシング反応を抑制でき、効率よく外来タンパク質を生産可能な形質転換植物、形質転換細胞、タンパク質生産キットおよびタンパク質の生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

1990年代初頭より、植物細胞における外来有用タンパク質の生産、いわゆる分子農場の概念が提唱され、その実現のため数多くの研究がなされている。その中で、ウイルスベクターを利用した方法は、植物ウイルスの持つ際立った増殖力を利用できることから、

10

20

30

40

50

最も有力な手段の一つとされてきた。

【 0 0 0 3 】

例えば、植物ウイルスのRNA複製酵素遺伝子のcDNA，および外被タンパク質遺伝子と外来遺伝子を置き換えた組換えウイルスゲノムRNA cDNAとをそれぞれ別個に植物ゲノムに導入し、外来遺伝子を発現させる方法等が知られている（特許文献1）。

【 0 0 0 4 】

しかしながら、細胞は、その活動に不適切なRNAを効率よく排除するために、特定の配列を持つRNAを選択的に分解する反応系である転写後型ジーンサイレンシング（PTGS；posttranscriptional gene silencing）を起動する。その結果、サイレンシングサプレッサーを持たないウイルスをベクターとして用いた誘導ウイルスベクター形質転換植物においては、感染後期になると、サイレンシング反応によってウイルスベクターRNAの蓄積が低下し、外来タンパク質の発現が妨げられる（非特許文献1）。なお、ここで「サイレンシング」とは植物が有する機構の一つで、ウイルスRNAまたはmRNAが配列特異的に分解されることにより、ウイルスの複製または特定の遺伝子の発現が抑制される現象を意味する。

10

【 0 0 0 5 】

これを避けるために、サイレンシングサプレッサーの遺伝子をウイルスベクターとは別に導入し、発現させることにより、サイレンシング反応を抑制することが考えられている（例えば、非特許文献2）。

【 0 0 0 6 】

なお、本明細書において「サイレンシングサプレッサー」とは、その働きによりサイレンシング機構を抑制するタンパク質を意味し、具体的にはサイレンシング反応が誘導された植物に導入した場合にサイレンシング反応を抑制し、その結果遺伝子発現の抑制を解除する活性を有するタンパク質を意味する。あるタンパク質におけるサイレンシングサプレッサー活性の有無は、GFPを発現する植物で、目的の蛋白質とサイレンシング誘導配列を同時に発現させるアグロバクテリウムコインフィルトレーションアッセイ法により調べることができる（Voinnetら，2000，Cell 103，157-167.）。それによりサイレンシング抑制活性を有するとされたものについては、サイレンシングサプレッサーであると定義される。

20

【 0 0 0 7 】

しかしながら、サイレンシングサプレッサーを恒常的に発現する植物は、その生育が異常になる場合が多く、外来タンパク質の発現改善を目的としたサイレンシング反応の抑制に利用できないという問題がある（非特許文献3）。これに対し、サイレンシングサプレッサーとして、ある特定の部位に変異を導入したタバコエッチウイルス（TEV）のHC-Pro変異体を用いることにより、ジャガイモウイルスX（PVX）をベクターとして用いた増幅系において、HC-Proを恒常的に発現させても植物の生育異常が発生しないという研究が報告されている（非特許文献3）。

30

【特許文献1】日本国公開特許公報「特開平6-46874号公報（公開日：平成6年2月22日）」

【非特許文献1】飯 哲夫、「ジーンサイレンシングとサプレッサー」、化学と生物 41 (2003) 390-397.

40

【非特許文献2】Olivier Voinnet et al. Plant J., 33, 949-956, 2003.

【非特許文献3】Allison C. Mallory et al. Nature Biotech., 20, 622-625, 2002

【発明の開示】

【 0 0 0 8 】

このように、サイレンシングサプレッサーを恒常的に発現する植物は、その生育が異常になる場合が多い。また、上述のように、ある特定の部位に変異を導入したHC-Pro変異体は、PVXベクターを用いた増幅系ベンサムアーナ植物に導入した場合には、恒常的に発現させても生育異常が発生しないことが報告されている。

【 0 0 0 9 】

50

しかしながら、ここに挙げられているのはP V Xの例のみであり、他の全てのウイルスベクターについても上記変異体が効果を示すかどうかは明らかではない。また、特定の場
合において、H c - P r oが効果を示さないことが報告されており (Simmons and Vander
Gheynst, 2007, Biotechnology Letters, 29, 641-645)、この場合には上記H c - P r
o変異体は利用できない。さらに、サイレンシングサプレッサーの作用機作は、いくつが
異なるものが知られており、このことは、サイレンシングサプレッサーを持つ植物ウイル
スの増殖メカニズムの多様性を反映していると考えられる。すなわち、遺伝子発現に用い
るウイルスベクターの種類によって、それぞれサイレンシング反応の抑制に好適なサイレ
ンシングサプレッサーは異なると考えられる。

【0010】

10

しかしながら、H c - P r o以外のサイレンシングサプレッサー、特にH c - P r oと
配列相同性が低いサイレンシングサプレッサーやH c - P r oと作用機作が異なるサイレ
ンシングサプレッサーを用いて、非特許文献3に記載されているような、その発現によ
って生育阻害を生じないサイレンシングサプレッサー変異体を作製することは、一般に植物
の正常な生育にはマイクロRNAによって誘導されるサイレンシング反応が関与している
ことを考慮すると、かなりの試行錯誤を伴うか、あるいは実現困難であると考えられる。

【0011】

ここで、プロムモザイクウイルス (brome mosaic virus, B M V)、cucumber mosaic
virus (C M V)、alfalfa mosaic virus (A l M V)のような、ウイルスゲノムが3本
のRNA鎖に分かれている植物RNAウイルスは、次の(1)~(3)のような利点を備
えているため、ベクターとして非常に有用である。(1)ゲノムサイズが短いため、遺伝
子操作が容易である。(2)ゲノムサイズが短いため、イントロンがない場合に、ゲノム
サイズが長い遺伝子よりも転写効率がよい。(3)複製酵素と外来タンパク質遺伝子が分
離しているため、交配によって容易に様々な外来遺伝子を発現可能な形質転換植物が作製
できる。

20

【0012】

とりわけB M Vは植物RNAウイルスのなかで基礎的な研究が最も進んでいるため、ベ
クター改良に必要な複製メカニズム等に関する知見が集積していること (KAO & SIVAKUMA
RAN, 2001, Mol. Plant Pathol. 1, 91-97)、増殖能力が他のウイルスに比して非常に大
きいこと、コムギやオオムギなどのイネ科植物において利用できること、等の利点を有し
ている。しかしながら、上記植物RNAウイルスのうち、既知のサイレンシングサプレッ
サーを持たないものについては、ウイルスベクターとして用いても、サイレンシング反応
により、形質転換体において目的の遺伝子の発現が低下してしまうという問題点がある。
したがって、上記植物RNAウイルスを用いた増幅系において、サイレンシング反応を抑
制しつつ、植物の生育異常を抑制する必要がある。

30

【0013】

一方、非特許文献3に記載された技術は、上述のように、H C - P r o変異体が全ての
場合において適用できるとは限らないため、上記植物RNAウイルスベクターを用いた増
幅系に適用できるとは限らないという問題点がある。また、上記植物RNAウイルスベク
ターを用いた増幅系に適用できない場合は、上記(1)~(3)のような、B M V等の植
物RNAウイルスの特徴を十分に生かすこともできないという問題点もある。

40

【0014】

本発明は、上記従来課題に鑑みなされたものであり、その目的は、サイレンシングサ
プレッサーを有さない植物RNAウイルスベクターを用いた増幅系においても、サイレ
ンシングおよび生育異常を起こすことなく、効率的に外来タンパク質を生産可能な形質転換
植物、形質転換細胞、タンパク質生産キットおよびタンパク質の生産方法を提供すること
にある。

【0015】

本発明者は、上記の課題を解決するために、鋭意検討を重ねた結果、通常はサイレンシ
ングサプレッサーをコードするポリヌクレオチドの発現を抑制しておき、ウイルスベクタ

50

一の誘導発現が行われている場合に、上記ポリヌクレオチドを誘導発現することにより、植物RNAウイルスベクターを用いた増幅系においても、サイレンシングおよび生育異常を起こすことなく、効率的に外来タンパク質を生産できることを発見し、本発明を完成させるに至った。

【0016】

すなわち本発明は、以下の発明を包含する。

【0017】

本発明に係る形質転換植物は、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサプレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換植物であって、上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであることを特徴としている。

10

【0018】

上記構成によれば、ウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つと、サイレンシングサプレッサーであるNSsタンパク質とが、恒常的な発現ではなく、いずれも誘導発現される。それゆえ、通常は、サイレンシングサプレッサーであるNSsタンパク質の遺伝子発現を抑制しておき、ウイルスベクターの誘導発現が行われている場合に、NSsタンパク質を誘導発現させることができる。

20

【0019】

そのため、サイレンシングサプレッサーを持たないウイルスベクターを用いて形質転換を行った植物でも、サイレンシング反応を抑制し、感染後期におけるウイルスベクターRNAの蓄積量を増やすことができるとともに、生育異常を回避することができる。したがって、形質転換植物において、外来タンパク質の発現量を効率的に増加させることができる。

【0020】

また、BMV等の植物RNAウイルスベクターを用いた増幅系でもサイレンシングが起こらないので、背景技術の項に記載した(1)~(3)のような植物RNAウイルスベクターの特徴を十分に発揮させることができる。したがって、外来遺伝子に基づくタンパク質を効率的に生産することができる。

30

【0021】

また、本発明に係る形質転換植物は、上記植物RNAウイルスがプロムモザイクウイルスであることが好ましい。BMVは、既知のサイレンシングサプレッサーを有さない。また、(1)感染植物細胞内における増殖量が多いこと、(2)ゲノムが分割されているという特徴から、複製酵素のみが複製に必要であり、RNA3の産物である3aタンパク質およびRNA4の産物である外被タンパク質ともウイルス複製に関与しないことから、外被タンパク質遺伝子への外来遺伝子の置き換えによってウイルス複製の制御機構が影響を受けにくい、等の利点を持っている。

40

【0022】

また、形質転換植物で誘導発現することにより、サイレンシングが誘導されるまでの時期においては、効率よく複製し、外来遺伝子を発現できることがわかっている(誘導mRNA増殖システム)(Mori et al. (2001) Plant J. 27(1), 79-86)。

【0023】

したがって、BMVベクターは、ウイルスベクターが誘導発現されているときにNSsタンパク質を誘導発現し、外来タンパク質を高効率で生産するという、本発明のメカニズムに好適なベクターであるといえる。上記構成によれば、外来タンパク質をより効率よく生産することができる。

【0024】

50

また、本発明に係る形質転換植物は、上記プロモーターが、ステロイドホルモンによって誘導されることが好ましく、上記ステロイドホルモンはデキサメタゾンであることが好ましい。

【0025】

ステロイドホルモンは、標的細胞内で、ステロイドホルモンと特異的な強い結合を示す細胞質受容体と複合体を形成し、種々の遺伝子の転写制御を行うことが知られている。また、デキサメタゾンは、最も強力な作用を持つグルココルチコイドの一つであることが知られている。したがって、上記構成によれば、ウイルスベクターおよびNSsタンパク質の誘導発現をより好適に行うことができる。

【0026】

また、本発明に係る形質転換植物は、マメ科、セリ科、アブラナ科、ウリ科、ナス科およびイネ科よりなる群より選ばれる科に属することが好ましく、ペンサミアーナ植物であることが特に好ましい。

【0027】

特許文献1に記載されているように、上記植物は、植物RNAウイルスの宿主として好適に用いられることが知られている。また、ペンサミアーナ植物を用いた系では、後述する実施例に示すように、BMVベクターとNSsタンパク質の両方を好適に誘導発現することに成功している。したがって、これらの植物は、本発明を適用し、外来タンパク質を生産させる上で有用であるということが出来る。

【0028】

本発明に係る形質転換細胞は、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサプレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換細胞であって、上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであることを特徴としている。

【0029】

上記構成によれば、形質転換細胞においては、通常はサイレンシングサプレッサーであるNSsタンパク質の遺伝子発現が抑制されており、ウイルスベクターが誘導発現されている場合にNSsタンパク質が誘導発現される。したがって、例えば、上記形質転換細胞を培養することにより、サイレンシング反応が抑制され、かつ、生育異常を起こすことのない植物体を得ることができ、外来タンパク質を効率的に生産することができる。

【0030】

また、本発明に係る形質転換細胞では、上記植物RNAウイルスがプロムモザイクウイルスであることが好ましい。上述のように、BMVウイルスベクターは、外来タンパク質の生産に好適であるといえるため、上記構成によれば、外来タンパク質をより効率よく生産することができる。

【0031】

また、本発明に係る形質転換細胞では、上記プロモーターが、ステロイドホルモンによって誘導されることが好ましく、上記ステロイドホルモンはデキサメタゾンであることが特に好ましい。上述のように、ステロイドホルモンは、種々の遺伝子の転写制御を行うことができるため、上記構成によれば、ウイルスベクターおよびNSsタンパク質の誘導発現を好適に行うことができる。

【0032】

また、デキサメタゾンは、最も強力な作用を持つグルココルチコイドの一つであるため、上記構成によれば、ウイルスベクターおよびNSsタンパク質の誘導発現をより好適に行うことができる。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明に係るタンパク質生産キットは、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを少なくとも含むタンパク質生産キットであって、上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであることを特徴としている。

【0034】

上記キットは、上記植物RNAウイルスベクターと、上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを少なくとも含むので、形質転換細胞や形質転換植物体等の形質転換体において、通常はサイレンシングサブレッサーであるNSsタンパク質の遺伝子発現が抑制されており、ウイルスベクターが誘導発現されている場合にNSsタンパク質が誘導発現されるという状態にすることができる。したがって、ステロイドホルモン等の誘導物質を用いれば、サイレンシング反応を抑制でき、かつ、生育異常を起こさず、任意の有用タンパク質を生産可能な植物を簡易に作製することができる。

10

【0035】

本発明に係るタンパク質生産キットでは、上記植物RNAウイルスがブロムモザイクウイルスであることが好ましい。上述のように、BMVベクターは、外来タンパク質の生産に好適であるため、上記キットを用いれば、生育異常を起こさず、サイレンシング反応を抑制でき、任意の有用タンパク質を生産可能な植物をより簡易に作製することができる。

20

【0036】

本発明に係るタンパク質生産キットは、さらに、ステロイドホルモンを含むことが好ましく、上記ステロイドホルモンはデキサメタゾンであることが好ましい。上記構成によれば、ステロイドホルモンの転写誘導作用により、ウイルスベクターおよびNSsタンパク質の誘導発現を好適に行うことができる。

【0037】

本発明に係るタンパク質の生産方法は、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターを植物に導入する工程と、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物に導入する工程と、上記植物を転写誘導する工程と、を少なくとも含むタンパク質の生産方法であって、上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備え、上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に、発現誘導型のプロモーターを備えることを特徴としている。

30

【0038】

上記構成によれば、通常はサイレンシングサブレッサーであるNSsタンパク質の遺伝子発現を抑制しておき、ウイルスベクターの誘導発現が行われている場合にNSsタンパク質を誘導発現させることができ、NSsタンパク質の発現時期を最適化することができるので、サイレンシング反応を抑制し、感染後期におけるウイルスベクターRNAの蓄積量を増やすことができるとともに、植物の生育異常を回避することができる。したがって、外来タンパク質の発現量を効率的に増加させることができる。

40

【0039】

本発明に係るタンパク質の生産方法は、上記植物RNAウイルスがブロムモザイクウイルスであることが好ましい。

【0040】

本発明に係るタンパク質の生産方法では、上記転写誘導はステロイドホルモンによって行われることが好ましい。

【0041】

本発明に係るタンパク質の生産方法では、上記植物は、マメ科、セリ科、アブラナ科、

50

ウリ科、ナス科およびイネ科よりなる群より選ばれる科に属することが好ましい。

【0042】

本発明に係るタンパク質の生産方法では、上記植物は、ベンサミアーナ植物であることが好ましい。

【0043】

本発明の他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、添付図面を参照した次の説明によって明白になるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】本実施例においてベンサミアーナ植物に導入されている遺伝子の概念図を示すものである。

【図2】GVG1 x B2 x GR x GVG-2 b植物と、GVG1 x B2 x GR x GVG-NSs植物におけるノーザンブロッティングの結果を示すものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0045】

本発明の実施の一形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0046】

(1. 本発明に係る形質転換植物)

本発明に係る形質転換植物は、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサプレッサーポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換植物であって、上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、上記サイレンシングサプレッサーポリヌクレオチドは、上記NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に、発現誘導型のプロモーターを備える。

【0047】

なお、本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は「核酸」または「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体が意図される。

【0048】

(1-1. 植物RNAウイルス)

本発明において、利用される植物RNAウイルスは、サイレンシングサプレッサーを含まない植物ウイルスであり、好ましくはウイルスゲノムが複数本の(+)鎖RNAから構成されるものである。より好ましくは、BMV、AIMV、cowpea chlorotic mottle virus (CCMV)であり、特に好ましくはBMVである。なお、上記CCMVは、BMVと極めて近縁なプロモウイルス属のウイルスであり、特にマメ科でよく増えるという特徴を有する。

【0049】

本明細書において、「植物RNAウイルスベクター」とは、複製可能なウイルスRNAを転写可能に含むcDNAであって、外来遺伝子を発現可能に含むもの、またはこれから転写されたRNAをいう。上記cDNAは複数であってもよく、上記cDNAが複数である場合、それぞれのcDNAは、別々のウイルスゲノムに由来していてもよい。例えば、BMVはウイルスゲノムがRNA1, RNA2, RNA3という3本のRNA鎖に分かれているが、この場合、植物RNAウイルスベクターとは、RNA1, RNA2, RNA3を転写可能に含むcDNAであって、外来遺伝子を発現可能に含むもの、または当該cDNAから転写されたRNA、となる。

【0050】

また、例えばCMVのように、元来サイレンシングサプレッサーを有しているウイルス

10

20

30

40

50

であっても、サイレンシングサプレッサーをコードするポリヌクレオチドを除去すれば使用可能である。当該除去を行う方法としては、特に限定されるものではないが、PCR法等を使用してウイルスcDNAのサイレンシングサプレッサー遺伝子に変異を導入することにより不活化する方法等が挙げられる。

【0051】

本発明は、サイレンシングサプレッサーを持たないウイルスをベクターとして用いた形質転換体において、サイレンシングを回避するとともに、植物の生育異常を回避し、その結果、形質転換体における外来タンパク質の生産向上を図ることを目的としている。

【0052】

これらのウイルスのRNA複製酵素遺伝子を含むcDNAは植物ゲノムに導入されるか、もしくはin vitroで合成されたRNAとして接種される。BMV、CMV、AIMV、CCMVの場合、ゲノムは3種類のRNAに分かれており、本発明において最も扱いやすいウイルスである。これら以外のウイルスでも、サイレンシングサプレッサーを含まず、RNA複製酵素遺伝子と外被タンパク質遺伝子を、それぞれを単独で発現できる状態で植物ゲノムに組み込むことができるものであれば、本発明において利用可能である。

10

【0053】

BMV、CMV、AIMV、CCMVを例にとれば、本発明において、植物ゲノムに導入されるべく改造される部分は、RNA1、2及び3であり、改造されたRNA3のうち所望の外来遺伝子によって置き換えられるのは3'末端側の外被蛋白質遺伝子部分である。ウイルスゲノムが導入される植物としては、ベンサムアーナ、タバコ、ダイズ、インゲン、キュウリ、ジャガイモ、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、シロイヌナズナ、ミヤコグサなどがあげられるが、これらに限られるわけではない。

20

【0054】

上記した植物ウイルスは、それぞれの宿主となる植物が異なる。例えば、BMVはイネ科に属する多くの植物を宿主とするが、タバコ植物へのウイルス粒子又はウイルスRNAの接種では、BMVは植物体中で増殖しないために、タバコはBMVの宿主と考えられていない。しかし、BMV粒子又はRNAをタバコプロトプラストに接種すると、細胞中でウイルスRNAが複製され外被蛋白質の生産がおこることが報告されている(Maekawara、(1985) Ann. Phytopath. Soc. Japan 51: 227-230)。

30

【0055】

このことは、ウイルス遺伝子を植物細胞中で発現できれば、従来のウイルスと宿主の関係に捕らわれる必要はないことを示唆している。従って、本発明において、ウイルス遺伝子を植物ゲノムに導入する場合にも、従来のウイルスと宿主の概念に捕らわれずに本発明を適用する植物を選ぶことができる。また、植物細胞とはカルスおよびプロトプラストを含む概念である。

【0056】

(1-2. 植物RNAウイルスベクターの構築)

ウイルスRNAは、RNA抽出法として公知の方法、例えばグアニジン法、熱フェノール法、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)フェノール法等を用い、ウイルス粒子から抽出することができる。BMV、CMV、AIMV、CCMVの場合、ゲノムが数種類のRNAからなるため、アガロースゲル電気泳動でRNA1、2及び3として分画精製する。それぞれのRNAの相補性DNA(cDNA)の構築は、常法の遺伝子操作技術を利用して行うことができる(Ahlquistら、(1984) J. Mol. Biol. 172: 369-383; Moriら、(1991) J. Gen. Virol. 72: 243-246)。

40

【0057】

本発明において、RNA複製酵素遺伝子を含むゲノムRNA、例えばBMV、CMV、AIMV、CCMVの場合、RNA1及び2は、i) 植物で機能するプロモーター、ii) RNA1又は2のcDNA、iii) 植物で機能するターミネーターからなるDNA分

50

子、あるいは、i) 植物で機能するプロモーター、ii) 1 a 蛋白質又は 2 a 蛋白質遺伝子をコードする配列、iii) 植物で機能するターミネーターからなる DNA 分子として、それぞれ植物ゲノムに導入される。

【0058】

そのような DNA 分子が導入された形質転換植物細胞では、RNA 1 及び RNA 2、あるいは 1 a 蛋白質又は 2 a 蛋白質の mRNA が転写され、1 a 及び 2 a 蛋白質が生産される。RNA 3 の cDNA の外被蛋白質遺伝子領域は所望の外来遺伝子と組換えられ組換え体 RNA 3 cDNA が構築された後、i) 植物で機能するプロモーター、ii) 組換え体 RNA 3 cDNA、iii) 植物で機能するターミネーターからなる DNA 分子として、上述の 1 a 及び 2 a 蛋白質が生産される植物のゲノムに導入される。

10

【0059】

i) 植物で機能するプロモーター、ii) 植物ウイルスの RNA 複製酵素遺伝子、又はそれを含むウイルス RNA の cDNA、例えば RNA 1、2 又は組換え体ウイルスゲノム RNA の cDNA、例えば RNA 3 の cDNA、iii) 植物で機能するターミネーターからなる DNA 分子を植物ゲノムに導入するために使用される植物 RNA ウイルスベクターとしては、RNA を遺伝子とするウイルス由来のウイルスベクターであり、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサプレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まないウイルスベクターであれば特に限定されるものではないが、植物細胞のゲノムに組み込まれる性質を有し、植物体内におけるタンパク質生産に好適であるため、Tiプラスミドベクターを特に好適に用いることができる。

20

【0060】

例えば、Mori et al. (2001) Plant J. 27(1), 79-86 に記載されているベクター；RNA 1 の cDNA 形質転換用 Tiプラスミドベクターである pTA7001BB1、RNA 2 の cDNA 形質転換用 Tiプラスミドベクターである pBICBPB2R、RNA 3 の形質転換用 Tiプラスミドベクターである pBICHGCP2IFNR、pBICHGCP2smGFPR 等を用いることができる。

【0061】

また Mori et al. (1992) J. Gen. Virol. 73, 169-172. に記載されているベクター；RNA 1 の cDNA 形質転換用 Tiプラスミドベクターである pBICBR1, pBICBR1(-3)、RNA 2 の cDNA 形質転換用 Tiプラスミドベクターである pBICBR2, pBICBR2(-3)、Mori et al. (1993) F E B S L e t t . 336(1), 171-174. に記載されているベクター；RNA 3 の形質転換用 Tiプラスミドベクターである p B I C B P C P 2 I F N 等を用いることができる。また、上記ベクターは、リボザイム配列を有していてもよい。

30

【0062】

上記リボザイム配列としては、任意のタンパク質をコードする遺伝子を挿入したウイルスベクターの cDNA から転写されたウイルス RNA の 3' 末端に付加された余分な配列を切断できるものであればよく、特に限定されるものではない。例えば、肝炎デルタウイルスのリボザイム配列またはサテライトタバコリングスポットウイルスのリボザイム配列を用いることができる。

【0063】

上記「発現させるタンパク質」とは、本発明に係る形質転換植物、または、後述する本発明に係る形質転換細胞において生産させることを意図する任意のタンパク質を意味する。生産させる任意のタンパク質は特に限定されるものではなく、外来の有用タンパク質であってもよく、当該植物が本来有するタンパク質であってもよい。例えば、医薬品として利用可能なヒトのタンパク質等が好適である。

40

【0064】

所望の外来遺伝子によって置き換え可能な部分は、1 a 蛋白質、2 a 蛋白質、3 a 蛋白質および外被蛋白質遺伝子の 1 番目の翻訳開始コドン、あるいは外被蛋白質遺伝子の 1 番目以降にある翻訳開始コドン、例えば 2 番目、3 番目など、からの部分である。所望の外来遺伝子をこれらの部位に導入するためには、置き換えられる遺伝子の翻訳開始コドン (A T G) および外来遺伝子の翻訳開始コドンに K u n k e l らの方法 (K u n k e l ら、

50

(1987) *Methods in Enzymology* 154:367-382) によって *NsiI* 切断部位を導入しておき、*NsiI* で切断後 T4 DNA ポリメラーゼで一本鎖部分を取り除き平滑末端化した後結合することによって、翻訳の読み枠を変えることなく (インフレームに) 外来遺伝子の置き換えが行える。

【0065】

さらに、外被タンパク質遺伝子の翻訳開始コドンに変異を導入したうえで、それより下流の部分に所望の外来タンパク質遺伝子を翻訳可能に導入してもよく、外被タンパク質遺伝子の翻訳開始コドンよりも上流に所望の外来タンパク質遺伝子を翻訳可能に導入しても良い。

【0066】

上記植物 RNA ウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えていることが必要である。これにより、後述する *NSs* タンパク質の発現と同時に上記ウイルスベクター発現させ、複製させることが可能となる。

【0067】

ここで、発現誘導型のプロモーターとは、転写因子が転写誘導物質あるいは熱などの特定の刺激によって活性化された場合にのみ、プロモーターの下流に連結されたポリヌクレオチドの転写が開始される場合のプロモーターをいい、恒常発現型のプロモーターとは、転写因子を転写誘導物質あるいは熱などの特定の刺激で活性化しなくても、プロモーターの下流に連結されたポリヌクレオチドの転写が開始される場合のプロモーターをいう。

【0068】

「上記植物 RNA ウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つ」とは、上述の *BMV* のように、ウイルスゲノムが数本の (+) 鎖 RNA から構成されるものである場合、ウイルスをコードするポリヌクレオチドのうちいずれか一つ以上が、上流に発現誘導型のプロモーターを備えていればよいことを意味する。これにより、デキサメタゾンなどの転写誘導物質あるいは熱などの特定の刺激で処理した場合のみ、プロモーターが誘導されてウイルスの複製酵素が形成され、外来タンパク質の mRNA が増幅される。

【0069】

例えば、後述する実施例では、*BMV RNA 1* の cDNA の上流に 6XUASGal4 が連結され、*BMV RNA 2* の cDNA、および、*BMV RNA 3* の cDNA 上の外被タンパク質遺伝子が GFP 遺伝子に置換された cDNA の上流に、恒常発現型のプロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス (*CaMV*) 35S プロモーターが連結されている。このように、植物 RNA ウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドであって、発現誘導型プロモーターを備えていないポリヌクレオチドは、上流に恒常発現型のプロモーターを備えていることが好ましい。

【0070】

ただし、誘導の形態としてはこれに限られるものではない。例えば、*RNA 1* と *RNA 2* の cDNA の上流に恒常発現型のプロモーターが連結され、外来遺伝子を導入した *RNA 3* の cDNA の上流に誘導発現型のプロモーターが連結されている誘導の形態も可能である。

【0071】

発現誘導型のプロモーターとしては、特に限定されるものではなく、従来公知のプロモーターを使用すればよい。例えば、ステロイドホルモンで転写誘導可能なプロモーター、グルココルチコイドで転写誘導可能なプロモーター、熱刺激で転写誘導可能なプロモーター、メタロチオネインプロモーター等を好適に用いることができる。具体的には、デキサメタゾンで転写誘導可能なプロモーターである 6XUASGal4、エクジソンで転写誘導可能なプロモーターである GRE、エストロジェンで転写誘導可能なプロモーターとして OLexA-46、熱刺激で転写誘導可能なヒートショックプロモーターとして シロイヌナズナ *HSP 18.2* プロモーター等を用いることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

恒常発現型のプロモーターも、特に限定されるものではなく、従来公知のプロモーターを使用することができる。例えば、C a M V 3 5 S プロモーターや、イネアクチン1プロモーター等を用いることができる。

【 0 0 7 3 】

上記転写誘導可能なプロモーターを用いて転写を制御する場合、転写誘導物質あるいは熱などの刺激により活性化される転写因子が必要である。当該転写因子としては、用いるプロモーターに適したものを選択して使用すればよい。例えば、プロモーターとして6XUA SGal4を用いる場合には、転写因子としてはGVGが選択され、エストロゲンで転写誘導可能なプロモーターであるOLexA-46を用いる場合には、転写因子としてはX V E が選択され、エクジソンで転写誘導可能なプロモーターとしてG R Eを用いる場合には、転写因子としてはエクジソンレセプターGR Act and DBDとヘルペスウイルストランスアクチベーションドメインHecR LBDのキメラタンパク質が選択される。H S P 1 8 . 2 プロモーターを用いる場合等は、内在性の転写因子が利用できる。

10

【 0 0 7 4 】

転写因子をコードする遺伝子は、植物に広く使用されている恒常発現型のプロモーター、例えばC a M V 3 5 S プロモーターの下流に配置することが好ましい。また、転写誘導可能なプロモーターを用いて転写を制御する場合は、転写因子を不活性化しておくことが好ましい。これによって、転写因子は、恒常的に発現するが、通常は不活性化状態で存在し、ステロイドホルモン等の転写誘導物質や、熱などの刺激で処理した場合にのみ活性化されて、プロモーター下流の遺伝子が転写されることになる。

20

【 0 0 7 5 】

転写誘導物質としては、特に限定されるものではない。例えば、ステロイドホルモン等を用いることができる。ステロイドホルモンとしては、特に限定されるものではなく、アンドロゲン、エストロゲン、ゲスターゲン、コルチコイドの何れであってもよい。エストロゲンとしては、エストラジオールであることが好ましく、特に本発明に係る形質転換細胞においては、後述するデキサメタゾンによる誘導の他に、エストラジオールによる誘導も効果的である。

【 0 0 7 6 】

コルチコイドとしては、ミネラルコルチコイドであってもグルココルチコイドであってもよいが、グルココルチコイドであることが好ましい。グルココルチコイドは、細胞内でグルココルチコイドレセプターと結合し、種々の遺伝子の転写制御を行うことが知られているため、ウイルスベクターおよびN S s タンパク質の誘導発現を好適に行うことができる。

30

【 0 0 7 7 】

グルココルチコイドとしては、特に限定されるものではなく、コルチゾール、コルチコステロン、コルチゾン、デキサメタゾン、プレドニソロン等を用いることができる。中でも、グルココルチコイド中、最も強力な転写誘導物質であり、最も効率的に転写因子を活性化することができるため、デキサメタゾンであることが特に好ましい。ミネラルコルチコイドとしては、特に限定されるものではないが、アルドステロン、9 -フルオロコルチゾール等を用いることができる。

40

【 0 0 7 8 】

また、転写誘導物質として、例えば、カドミウム、亜鉛、銅、水銀、金、銀、ビスマス、これらの金属のイオンを用いることもできる。

【 0 0 7 9 】

転写誘導物質による処理の方法は特に限定されるものではなく、例えば、形質転換植物の植物体に転写誘導物質を塗布する方法や、形質転換細胞の培養系に転写誘導物質を添加する方法などを挙げることができる。また、熱刺激による遺伝子誘導の方法も特に限定されるものではなく、例えば4 2 の温室に2時間静置する方法などを挙げることができる。

50

【0080】

上記不活性化の方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、転写因子をコードする遺伝子を転写、翻訳後、転写因子中の転写誘導物質結合ドメインにヒートショックプロテイン等を結合させ、転写因子とヒートショックプロテイン等との相互作用をさせる方法を挙げることができる(Mori et al., Plant J. 27(1), 79-86, 2001)。

【0081】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) を用いた植物形質転換法としては、リーフディスク法 (Horschら、(1985) Science 227: 1229-1231) を利用することができる。

【0082】

Tiプラスミドにはvir領域があり、この領域の働きによって、Tiプラスミド中のT-DNA領域を*A. tumefaciens*の宿主細胞ゲノム中に導入できる(Nesterら、(1984) Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 387-413)。

【0083】

Tiプラスミドを用いた遺伝子導入法としては、現在バイナリーベクター法(以下「アグロバクテリウム法」とも記載する)が広く用いられている。これは、TiプラスミドをT-DNAの欠失したvir領域を持つTiプラスミドとT-DNAを含むバイナリーベクターとに分割して用いるものである。バイナリーベクターとは*A. tumefaciens*でも大腸菌でも増殖できるベクターである。プロモーター、ウイルスRNAのcDNA、ターミネーターで構成されるDNAは、バイナリーベクター中のT-DNA領域に組み込まれ、形質転換用ベクターが構築される。

【0084】

このような形質転換用ベクターをT-DNAの欠失したvir領域を持つTiプラスミドを保持する*A. tumefaciens*細胞中に導入し、該*A. tumefaciens*を宿主植物に接種すれば、vir領域の働きによって、該組み合わせの構成からなるDNAを含むT-DNA領域を宿主ゲノム中に導入しうる。その他の公知の遺伝子導入法、すなわちプロトプラストへのエレクトロポレーション(electroporation)法、リポゾーム融合、マイクロインジェクション、植物組織へのパーティクルガン(particle gun)あるいはそれらに準じた方法等によっても、上記構成からなるDNAを植物細胞に導入できる。

【0085】

上記植物細胞(形質転換細胞)の選抜には、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスホトリシン等の薬剤を用いることができる。形質転換細胞は、適宜の培地で培養してカルス形成、カルス増殖、さらに必要に応じて不定胚分化または器官分化を行い、ついで植物ホルモンを添加した植物体再分化用培地で植物体に再生させることができる。

【0086】

双子葉植物に本発明を使用する場合には、対象の植物は、マメ科(アルファルファ、ダイズ、クローバー、インゲン、ミヤコグサなど)、セリ科(ニンジン、セロリなど)、アブラナ科(キャベツ、ダイコン、ナタネ、シロイヌナズナなど)、ナス科(ジャガイモ、タバコ、トマトなど)がある。ナス科の植物の場合は、ベンサミアーナ植物(*Nicotiana benthamiana*)を特に好適に用いることができる。

【0087】

単子葉植物に使用する場合には、対象の植物としては、イネ科(イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシなど)がある。

【0088】

(1-3. NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチド)

本発明に係る形質転換植物は、NSsタンパク質をコードするポリヌクレオチドが導入されていることを要する。NSsタンパク質とは、Tomato spotted wilt virus(以下「TSWV」と記載する)の一本鎖RNAのうちS RNA(2.9kb)がコードするタ

10

20

30

40

50

ンパク質であり、サイレンシングサプレッサーとして機能することが知られている (Atsushi Takeda et al., FEBS Letters, 532, 75-79, 2002)。本発明者らは、上記植物RNAウイルスベクターと、当該NSタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換植物において、上記植物RNAウイルスベクターが誘導発現されている場合にNSタンパク質を誘導発現させることにより、サイレンシングを抑制すると共に、植物の生育異常を回避でき、植物RNAウイルスベクター中の外来タンパク質を効率よく生産することができることを見出した。

【0089】

NSタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、公知の遺伝子配列に基づき、従来公知の方法を用いて合成することができ、従来公知の方法を用いて上記ポリヌクレオチドを含むTiプラスミド等のベクターを構築し、当該ベクターを、バイナリーベクター法等の上述の方法を用いて植物細胞に導入できる。

10

【0090】

上記NSタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであることが必要である。上記発現誘導型のプロモーターとしては、(1-2)で説明したものと同様のプロモーターを用いることができる。

【0091】

この場合、発現誘導型のプロモーターによって上記ポリヌクレオチドの転写が制御されるので、転写誘導物質や熱などの刺激により活性化される転写因子が必要である。当該転写因子としては、用いるプロモーターに適したものを選択して使用すればよい。例えば、プロモーターとして6XUASGal4を用いる場合には、転写因子としてはGVGが選択され、エクジソンで転写誘導可能なプロモーターとしてGREを用いる場合には、転写因子としてはエクジソンレセプターGR Act and DBDとヘルペスウイルストランスアクチベーションドメインHecR LBDのキメラタンパク質が選択される。HSP18.2プロモーターを用いる場合等は、内在性の転写因子が利用できる。

20

【0092】

転写因子をコードする遺伝子は、植物に広く使用されている恒常発現型のプロモーター、例えばCaMV 35Sプロモーターの下流に配置することが好ましい。好適な転写誘導物質については(1-2)と同様である。

30

【0093】

(1-4. 本発明に係る形質転換植物、形質転換細胞およびタンパク質生産方法)

本発明に係る形質転換植物は、(1-2)で説明した植物RNAウイルスベクターと、(1-3)で説明したNSタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている。上記導入は、上述の公知の遺伝子導入法を用いることによって行うことができる。上記導入は、植物個体に直接行ってよいし、植物細胞、植物の断片等に導入し、導入された植物細胞や植物の断片を、(1-2)に記載した方法によって植物体に再生してもよい。植物としては、上述のように、双子葉植物であっても単子葉植物であってもよく、マメ科、セリ科、アブラナ科、ウリ科、ナス科およびイネ科よりなる群より選ばれる科に属することが好ましく、ベンサムアーナ植物であることが特に好ましい。

40

【0094】

本発明に係る形質転換細胞は、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサプレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物RNAウイルスベクターと、NSタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換細胞であって、上記植物RNAウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、ウイルスの複製酵素をコードするポリヌクレオチドの少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、上記NSタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであるが、当該形質転換細胞は、(1-2)で説明した植物RNAウイルスベクターと、(1-3)で説明したNSタンパク質をコードするポリヌ

50

クレオチドとを、上述の公知の遺伝子導入法を用いて植物細胞に導入することによって得ることができる。

【0095】

B M V等のようにウイルスゲノムが分節ゲノムである場合、分節ゲノムごとに構築したウイルスベクターをそれぞれ別個の植物に導入し、誘導発現後、導入されたc D N Aの発現量が高い個体を選抜し、当該個体を交配することによって、全ての分節ゲノムが導入された形質転換植物を得ることができる。さらに、当該形質転換植物を、N S sタンパク質をコードするポリヌクレオチドを導入し、誘導発現させた植物と交配させることにより、植物R N Aウイルスを誘導発現し、かつ、N S sタンパク質を誘導発現させた植物である、本発明に係る形質転換植物を得ることができる。

10

【0096】

ただし、本発明に係る形質転換植物を得る方法は、これに限られるものではなく、例えば、上記分節ゲノムごとに構築したウイルスベクターと、N S sタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを同一の植物に導入し、誘導発現させることによって得ることも可能である。

【0097】

本発明に係るタンパク質生産方法は、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサプレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物R N Aウイルスベクターを植物に導入する工程と、N S sタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物に導入する工程と、上記植物を転写誘導する工程と、を少なくとも含むタンパク質の生産方法であって、上記植物R N Aウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、ウイルスの複製酵素をコードするポリヌクレオチドの少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備え、上記N S sタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものである。

20

【0098】

上記植物R N Aウイルスベクターを植物に導入する工程と、N S sタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物に導入する工程は、上述のように公知の遺伝子導入法を用いて行うことができる。

【0099】

上記植物を転写誘導する工程を行う方法としては、特に限定されるものではなく、上記植物R N Aウイルスベクターと、N S sタンパク質をコードするポリヌクレオチドとが導入された植物体に転写誘導物質の溶液を塗布する方法、転写誘導物質の溶液を噴霧する方法、上記植物体を転写誘導物質の溶液に浸漬する方法等を用いることができる。熱などの転写誘導刺激により処理する工程を行う方法としては、特に限定されるものではなく、例えば42℃の温室に2時間静置する方法などを挙げることができる。

30

【0100】

上記植物を転写誘導する工程によって、ウイルスベクターの誘導発現とN S sタンパク質をコードするポリヌクレオチドの誘導発現とが行われる。すなわち、通常はサイレンシングサプレッサーであるN S sタンパク質をコードするポリヌクレオチドの誘導発現を抑制しておき、ウイルスベクターの誘導発現が行われている場合に上記ポリヌクレオチドを誘導発現することができる。その結果、サイレンシング反応を抑制できるため、感染後期におけるウイルスベクターR N Aの蓄積量を増やし、外来タンパク質の発現量を増やすことができ、しかも植物の生育阻害を回避することができる。

40

【0101】

なお、「ウイルスベクターの誘導発現が行われている場合に上記ポリヌクレオチドを誘導発現する」とは、ウイルスベクターの誘導発現とN S sタンパク質の誘導発現とが同時に起こっている時間が存在することを意味する。ウイルスベクターの誘導発現と、N S sタンパク質の誘導発現とを同時に開始してもよいが、必ずしもこれに限られるものではない。例えば、ウイルスベクター用の誘導発現型のプロモーターと、N S sタンパク質用の

50

誘導発現型プロモーターの種類を変えれば、ウイルスベクターの誘導発現開始時期とNS sタンパク質の誘導発現開始時期とをずらすことができる。

【0102】

上記転写誘導物質としては、(1-2)で説明した転写誘導物質と同様のものを用いることができる。中でもステロイドホルモンが好ましく、ステロイドホルモンの中ではグルココルチコイドがより好ましく、デキサメタゾンであることが特に好ましい。

【0103】

以上の工程を少なくとも含むことによって、本発明に係るタンパク質の生産方法では、上記植物RNAウイルスベクターに含まれる目的の有用タンパク質を生産することができる。

10

【0104】

(1-5. 本発明に係るタンパク質生産キット)

(1-2)で説明した植物RNAウイルスベクターおよび(1-3)で説明したNS sタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、有用な任意のタンパク質を生産する細胞または植物を作製するために利用できるものである。したがって、上記植物RNAウイルスベクターおよびNS sタンパク質をコードするポリヌクレオチド、並びに細胞の形質転換に必要な試薬、器具等をキット化しておけば、利用者は上記植物RNAウイルスベクターおよびNS sタンパク質を導入した形質転換植物または形質転換細胞を簡便に作製することが可能となる。

【0105】

本発明に係る形質転換用キットは、少なくとも上記植物RNAウイルスベクターおよびNS sタンパク質を含むものであればよく、他にどのような構成を有していてもよい。上記植物RNAウイルスベクターおよびNS sタンパク質以外のキット構成としては、例えば、細胞、培地、制限酵素、修飾酵素類、転写誘導用化学物質(ステロイドホルモン等)、培養フラスコ、アグロバクテリウム(植物細胞の場合)等を挙げることができる。

20

【0106】

(2. 本発明の有用性)

非特許文献3に記載されているように、PVXベクターを用いた増幅系において特定の部位に変異を導入したHC-Pro変異体を恒常的に発現させた場合、ベンサミアーナ植物の生育異常は起こらないことが示されている。

30

【0107】

したがって、BMV等のサイレンシングサプレッサーを持たないウイルスベクターを用いた増幅系でHC-Pro以外のサイレンシングサプレッサーを用いてサイレンシングを抑制しつつ有用タンパク質を生産することを考える場合、当業者は、通常、非特許文献3に記載されている技術、すなわち生育障害を起こさないサイレンシングサプレッサー変異体を作製し、恒常的に発現させる技術の利用を想起すると考えられ、本発明を用いることを想起するとは考えにくい。したがって、非特許文献3に記載された技術に基づいて本発明に想到することは当業者といえども容易ではないと考えられる。

【0108】

また、本発明は、サイレンシングサプレッサーを有さないウイルスベクターとして用いた形質転換植物においても、サイレンシング反応および植物の生育障害を回避しつつ、有用外来タンパク質の生産性を向上させることができる。さらに、比較的容易に外来遺伝子を含むウイルスベクターを導入した形質転換植物を作製することができるという、BMV等のウイルスベクターが有する利点を十分に生かすことができるものである。このように、本発明は、非特許文献3に記載された技術の問題点を解決したものであり、非常に有用であるといえる。

40

【0109】

また、本発明者らは、Mori, M., Fujihara, N., Mise, K. and Furusawa, I. (2001) Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants. Plant J 27(1), 79-86.に記載されているように、BMVを用いた高効率mRNA

50

誘導増幅系を開発しているが、当該増幅系では、B M Vがサイレンシングサブレッサーを持たないため、増幅の後半にm R N Aの分解が顕著に認められるという問題点があった。当該問題点を解決するために、B M Vの代わりに、サイレンシングサブレッサーを持ち、かつ、かつ複製能力の高い一本鎖プラス鎖R N Aウイルスであるトマトモザイクウイルス（以下適宜「T o M V」と略記する。）を用いて高効率m R N A誘導増幅系の構築も行い、当該増幅系において有用タンパク質の生産効率を向上させることができることを確認している（特開2 0 0 5 - 1 1 0 5 9 4号公報）。

【0 1 1 0】

そのため、有用タンパク質を生産する場合、当業者は通常、サイレンシングサブレッサーの形質転換が不要である上記T o M Vベクターを用いた増幅系を用いるものと考えられ、サイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドを形質転換によって導入する必要のある本発明を用いることは通常想起しないと考えられる。

10

【0 1 1 1】

一方、本発明は、B M Vなどのウイルスベクターを用いた増幅系においてサイレンシングおよび植物の生育異常を解消したことにより、当該増幅系を用いたタンパク質の効率的な生産を可能にした。したがって、本発明は、非常に有用性の高いものであるといえる。

【0 1 1 2】

なお、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

【0 1 1 3】

本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

20

【実施例】

【0 1 1 4】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0 1 1 5】

(1) サブレッサー誘導発現用Tiプラスミドベクター作出

デキサメタゾン(D E X) 特異的遺伝子発現形質転換植物の作出には、T i プラスミド pTA7001(McNellisら, 1998, Plant J., 14, 247 - 257)を用いた。

30

【0 1 1 6】

また、pTA7001を鋳型とし、プライマー5' -CGACTCTAGAGGATCCGGGTGACAG-3' (配列番号1) および5' CCGCTCGAGAGGCCCTCCAAA- ' 3 (配列番号2)を用いたP C Rにより増幅したD N A断片をXbaIとXhoIで部分切断し、pTA7001のXbaI / XhoIサイトへ挿入することにより、pTA7001の6xUASgal4プロモーター下流のXhoI切断サイトをStuI切断サイトに置換したプラスミドpTA7001(Stu)を作出した。

【0 1 1 7】

5' 端側にStuIサイト、3' 端側にEcoRIを付加したT S W VのN S s遺伝子をP C R法によって合成し、得られたD N A断片をStuIおよびEcoRIで切断処理し、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化後pTA7001(Stu)の6xUASgal4プロモーター下流に位置するStuIサイトに挿入し、T i プラスミドベクターpTA7001-N S sを作出した。同様に、トマトブッシュスタントウイルス(TBSV) のP19遺伝子(GenBank AJ288943) を、その5' 端側および3' 端側に導入されたBamHIサイトで切断し、末端を平滑化後、pTA7001(Stu)のStuIサイトに挿入し、T i プラスミドベクター pTA7001-P19を作出した。

40

【0 1 1 8】

また、キュウリモザイクウイルス(CMV) 2 b 遺伝子(GenBank D12538: nt. 2420-2752) は、5' 端側に導入されたBamHIサイトで切断し、末端平滑化後さらに3' 端側に導入されたAvrIIサイトで切断した。得られた2 b 遺伝子を含む断片を、pTA7001の6xUASgal4プロモーター下流に位置するXhoI / SpeIサイトに挿入し、T i プラスミドベクター pTA7001-2

50

bを作出した。

【0119】

(2) プロムモザイクウイルスベクター誘導発現用Tiプラスミドベクター作出

6xUASgal4プロモーター下流に連結したBMV RNA1 cDNAの形質転換用TiプラスミドpTA7001と、35Sプロモーターの下流に連結したBMV RNA2 cDNAの形質転換用TiプラスミドpBICBPB2Rは、(Mori et al., Plant J. 27(1), 79-86, 2001)に記載されているものを用いた。上記6xUASgal4プロモーターの上流には、転写因子としてGVGが連結されており、GVGは35Sプロモーターの下流に連結されている。

【0120】

TiプラスミドpBICHGCP2smGFPRはpBICHGCP2IFNR (Mori et al., Plant J. 27(1), 79-86, 2001)に含まれるBMV RNA3ベクターのヒトガンマイナーフェロン遺伝子をsoluble-modified GFP遺伝子 (GenBank: U70495) と置換することにより作出したものであり、BMV RNA3 cDNA上の外被タンパク質遺伝子がGFP遺伝子に置換されており、さらにcDNAの3'末端には、リボザイム配列が付加されている。

10

【0121】

図1は、本実施例においてベンサミアナ植物に導入されている遺伝子の概念図を示すものである。図1の(a)~(c)に示すように、転写因子GVG, BMV RNA2およびBMV RNA3をコードするポリヌクレオチドは、恒常発現型のプロモーターの下流に連結されており、図1の(d)、(e)に示すように、BMV RNA1およびNSSをコードするポリヌクレオチドは、発現誘導型のプロモーターの下流に連結されている。

20

【0122】

(3) サプレッサー遺伝子の形質転換と誘導発現の確認

TiプラスミドベクターpTA7001-NSS、pTA7001-P19およびpTA7001-2bを用い、アグロバクテリウム法によって、6xUASgal4プロモーター下流に連結したNSS、P19または2b遺伝子を導入した形質転換ベンサミアナ植物を作出した。再分化したハイグロマイシン耐性植物の種子を播種し、4週間後、展開葉にDEX (30 μg/mlになるようエタノールに溶解したものを)を適量塗布した(DEX処理)。処理1日後に全RNAを抽出してノーザンブロッティングを行い、DEX特異的にNSS、P19または2b遺伝子が発現している形質転換植物を選抜した(夫々の植物を、GVG-NSS植物、GVG-P19植物、GVG-2b植物と称する)。

30

【0123】

(4) DEX処理によりプロムモザイクRNA1を誘導発現する植物

pBICBPB2R、pTA7001BB1、pBICHGCP2smGFPRを用い、それぞれアグロバクテリウム法によりベンサミアナ植物を形質転換し、6xUASgal4プロモーター下流に連結したBMV RNA1 cDNAを導入したGVG1植物、35Sプロモーター下流に連結したBMV RNA2 cDNAを導入した35S2植物、35Sプロモーター下流に連結した外被タンパク質遺伝子がGFP遺伝子と置換されたBMV RNA3 cDNAを導入した35SGR植物を得た。

【0124】

それぞれ導入したcDNAの発現量(GVG1植物についてはDEX処理後に誘導される発現量)の高い個体を選抜し、これらを交配することにより、上記3種類のcDNA遺伝子が全て導入された形質転換ベンサミアナ植物(GVG1 x B2 x GR植物)を得た。播種4週間後の展開葉にDEX処理を行ったところ、処理後2日目には、DEX特異的なGFP蛍光が蛍光実体型顕微鏡による観察によって認められ、ノーザンブロッティングにおいて、BMVのゲノムRNAおよびサブゲノムRNAの蓄積が認められた。しかしながら、処理後8日目にはGFP蛍光は消失し、BMVサブゲノムRNAの蓄積は低下した。

40

【0125】

(5) 交配

GVG1 x B2 x GR植物と、GVG-NSS植物、GVG-P19植物、およびGVG-2b植物をそれぞれ交配することにより、プロムモザイクウイルスベクターを誘導発現し、

50

さらにサブレッサー遺伝子を誘導発現する形質転換植物（GVG 1 x B2 x GR x GVG- N S s 植物、GVG 1 x B2 x GR x GVG-P19植物、GVG 1 x B2 x GR x GVG- 2 b 植物）を作出した。

【 0 1 2 6 】

図 2 は、GVG 1 x B2 x GR x GVG- 2 b 植物と、GVG 1 x B2 x GR x GVG- N S s 植物におけるノーザンブロッティングの結果を示すものである。得られた植物の播種 4 週間後の展開葉に DEX 処理を行ったところ、GVG 1 x B2 x GR x GVG- N S s 植物では、処理 2 日後にウイルスベクター R N A の蓄積が認められた。また処理 8 日後においてもウイルスベクター R N A の高い蓄積が認められ、さらに G F P 蛍光が観察された。処理後 8 日目のウイルスベクター R N A の蓄積量と、N S s 遺伝子の発現量には相関が認められたことから、誘導発現した N S s 遺伝子が処理後長期間経過後のウイルスベクター R N A の高い蓄積量に参与していることが明らかとなった。

10

【 0 1 2 7 】

一方、GVG 1 x B2 x GR x GVG-P19植物は、D E X 処理後に処理葉が壊死し、ウイルスベクター R N A および G F P を検出することが困難であった。また、GVG 1 x B2 x GR x GVG- 2 b 植物の場合は、処理後 2 日目にはウイルスベクター R N A の蓄積が認められたが、処理後 8 日目にはウイルスベクター R N A の量は低下した。このとき、G F P 蛍光は認められなかった。

【 0 1 2 8 】

以上の結果から、N S s 遺伝子には、他のサブレッサー遺伝子とは異なり、B M V ウイルスベクター誘導発現植物において、感染後期におけるウイルスベクター R N A と、外来タンパク質の蓄積量を増大させる効果があることが明らかとなった。

20

【 0 1 2 9 】

本発明に係る形質転換植物は、発現させるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、サイレンシングサブレッサーをコードするポリヌクレオチドを含まない植物 R N A ウイルスベクターと、N S s タンパク質をコードするポリヌクレオチドとが少なくとも導入されている形質転換植物であって、上記植物 R N A ウイルスベクターに含まれるポリヌクレオチドのうち、少なくとも一つは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えており、上記 N S s タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの上流に発現誘導型のプロモーターを備えるものであるという構成である。

30

【 0 1 3 0 】

したがって、N S s タンパク質の発現時期が最適化され、サイレンシング反応を抑制することができ、感染後期におけるウイルスベクター R N A の蓄積量を増やすことができるとともに、生育異常を回避することができる。それゆえ、本発明は、外来タンパク質の発現量を効率的に増加させることができるという効果を奏する。

【 0 1 3 1 】

発明の詳細な説明の項においてなされた具体的な実施形態または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する請求の範囲内において、いろいろと変更して実施することができるものである。

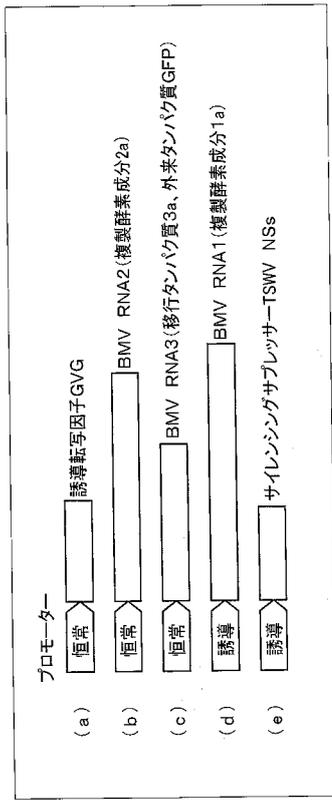
40

【産業上の利用可能性】

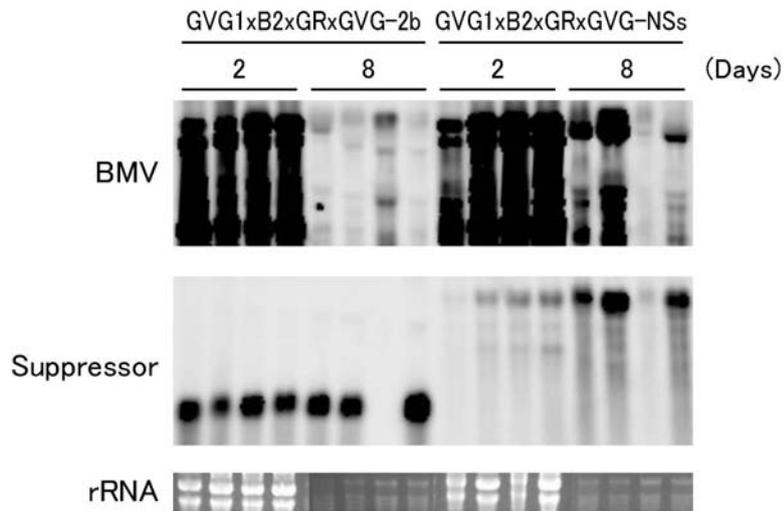
【 0 1 3 2 】

本発明は、サイレンシングサブレッサーを有さない植物 R N A ウイルスベクターを用いた増幅系においても、サイレンシングおよび生育異常を起こすことなく、効率的に外来タンパク質を生産可能な形質転換植物、形質転換細胞、タンパク質生産キットおよびタンパク質の生産方法を提供するものである。したがって、生産された有用タンパク質の用途により、医薬品産業や食品産業等に利用可能である。また、広く農業の発展にも大いに貢献できるものである。

【 図 1 】



【 図 2 】



【配列表】

2008117811000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2008/055637 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A01H5/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01H5/00, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | TAKEDA, A. et al., Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus, FEBS Letters, 2002.12, Vol. 532, pp. 75-79, Abstract, Fig. 1, Fig. 2 | 1-19 |
| Y | MORI, M. et al., Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants, The Plant Journal, 2001, Vo. 27, No. 1, pp. 79-86, summary, Firure 1 | 1-19 |
| Y | JP 2004-135597 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 13 May, 2004 (13.05.04), Par. No. [0002] (Family: none) | 1-19 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 11 April, 2008 (11.04.08) | | Date of mailing of the international search report 22 April, 2008 (22.04.08) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 5 6 3 7 | | | | | | | | | |
|---|---|--|-------------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01H5/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i | | | | | | | | | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01H5/00, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/00 | | | | | | | | | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2008年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2008年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2008年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2008年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2008年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2008年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2008年 | | | | | | | | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII) | | | | | | | | | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | | | | | | | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 | | | | | | | | | |
| Y | TAKEDA, A. et al., Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus, FEBS Letters, 2002.12, Vol. 532, pp. 75-79, Abstract, Fig. 1, Fig. 2 | 1-19 | | | | | | | | | |
| Y | MORI, M. et al., Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants, The Plant Journal, 2001, Vo. 27, No. 1, pp. 79-86, summary, Firure 1 | 1-19 | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | | | | | | | | | |
| * 引用文献のカテゴリー | | の日の後に公表された文献 | | | | | | | | | |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | | 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの | | | | | | | | | |
| 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | | 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの | | | | | | | | | |
| 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | | 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの | | | | | | | | | |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | | 「&」同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 11.04.2008 | | 国際調査報告の発送日 22.04.2008 | | | | | | | | | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 太田 雄三 | 4 B 3 9 5 9 | | | | | | | | |
| | | 電話番号 03-3581-1101 | 内線 3448 | | | | | | | | |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 5 6 3 7 |
|-----------------------|---|--------------------------------------|
| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | JP 2004-135597 A (住友化学工業株式会社) 2004.05.13, 【0002】 (ファミリーなし) | 1-19 |

 フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 DA01 DA05
 EA01 EA04 FA02 FA10 GA11 GA17 GA19 GA21 HA08 HA14
 4B064 AG01 CA11 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA88X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 BA24 BB04 CA24 CA44

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。