

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-166577
(P2004-166577A)

(43) 公開日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00 C	4 B O 6 5

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2002-335648 (P2002-335648)	(71) 出願人	391012442 京都大学長 京都府京都市左京区吉田本町36の1番地
(22) 出願日	平成14年11月19日(2002.11.19)	(74) 代理人	100080034 弁理士 原 謙三
		(72) 発明者	佐藤 文彦 京都府京都市左京区高野西開町34-1-2-501
		(72) 発明者	小林 昭雄 大阪府豊中市上野坂1-10-22
		(72) 発明者	福崎 英一郎 大阪府吹田市佐竹台4-4-2
		(72) 発明者	安 忠一 大阪府箕面市小野原東4-26-21-102

最終頁に続く

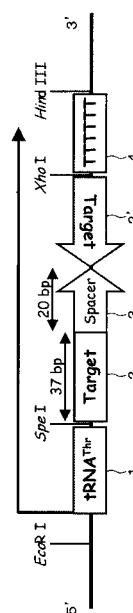
(54) 【発明の名称】 新規RNA干渉誘導ベクター、そのベクターを用いた遺伝子発現抑制方法、及びそのベクターが導入された形質転換体

(57) 【要約】

【課題】 作製が簡便で、遺伝子発現抑制効率がより高い新規RNA干渉誘導ベクター、及び、そのRNA干渉誘導ベクターを用いて遺伝子発現抑制を効率よく行う方法を提供する。

【解決手段】 本発明のRNA干渉誘導ベクターは、遺伝子の遺伝情報をコードするセンス鎖配列 (Target 2) と、そのアンチセンス鎖配列 (Target 2') とが組み込まれ、逆方向反復塩基配列構造を有するものであって、RNAポリメラーゼIIIのプロモーター配列である tRNA^{Thr} 1 が逆方向反復塩基配列の上流領域に組み込まれているものである。これによれば、RNA干渉誘導において、遺伝子発現抑制効率をより高くすることができるため、遺伝子の機能解析に有効に利用することができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

遺伝子の遺伝情報をコードするセンス鎖配列と、そのアンチセンス鎖配列とが組み込まれ、逆方向反復塩基配列構造を有するRNA干渉誘導ベクターにおいて、RNAポリメラーゼIIIのプロモーター配列であるtRNA^{Trp}がさらに組み込まれていることを特徴とするRNA干渉誘導ベクター。

【請求項 2】

前記RNA干渉誘導ベクターは、植物細胞に導入されることを特徴とする請求項1記載のRNA干渉誘導ベクター。

【請求項 3】

前記RNA干渉誘導ベクターがpUC18ベクターであることを特徴とする請求項1または2に記載のRNA干渉誘導ベクター。

【請求項 4】

前記センス鎖配列と前記アンチセンス鎖配列との間には、15bp以上50bp以下のスペーサー配列が設けられていることを特徴とする請求項1ないし3の何れか1項に記載のRNA干渉誘導ベクター。

【請求項 5】

前記スペーサー配列は、20bpからなることを特徴とする請求項4記載のRNA干渉誘導ベクター。

【請求項 6】

前記センス鎖配列および前記アンチセンス鎖配列は、それぞれ20bp以上100bp以下であることを特徴とする請求項1ないし5の何れか1項に記載のRNA干渉誘導ベクター。

【請求項 7】

前記RNA干渉誘導ベクターは、ターミネーター配列TTTTTTをさらに有することを特徴とする請求項1ないし6の何れか1項に記載のRNA干渉誘導ベクター。

【請求項 8】

請求項1ないし7の何れか1項に記載のRNA干渉誘導ベクターを宿主細胞に導入することによって、前記宿主細胞内で遺伝子の発現を抑制させる方法。

【請求項 9】

前記宿主細胞は植物細胞であることを特徴とする請求項8記載の遺伝子の発現を抑制させる方法。

【請求項 10】

請求項1ないし7の何れか1項に記載のRNA干渉誘導ベクターが導入された形質転換体。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、二本鎖RNAの細胞内への導入によって、その二本鎖RNAと相同な配列を持つ遺伝子の発現が抑制される現象であるRNA干渉を誘導するベクター、そのベクターを用いて遺伝子の発現を抑制させる方法、及びそのベクターが導入された形質転換体に関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

アンチセンスRNAとは、DNAより転写されるmRNA(センスRNA)に対し、その遺伝情報が裏返しとなった転写物のことを意味する。このアンチセンスRNAは、標的遺伝子からつくられるmRNAと構造的に相補性を有しているため、両者は互いに結合してRNA二重鎖(二本鎖RNA、dsRNAとも称する)を形成する。このように、言わば“フタ”をかぶされたmRNAは、特異的RNA分解酵素によって分解され、タンパク質合成の場への移行ができなくなり、本来の遺伝子の機能が抑制される。

10

20

30

40

50

【0003】

また、アンチセンスRNAのみならず、アンチセンスRNAとセンスRNAとが互いに結合して形成された上述のdsRNAも、細胞内へ導入されることによって、当該dsRNAと相同な配列を持つ遺伝子の発現を抑制するという現象を引き起こす。このdsRNAの導入によって遺伝子の発現が抑制される現象は、RNA干渉（或いは、RNAi、RNA interference）と呼ばれる。RNA干渉は極めて高い配列特異性を持つことから、ある特定の遺伝子の機能を探るためのツールとして線虫を中心に広く利用されている。また、それにとどまらず、上記dsRNAは、RNAを標的とした医薬品、農薬品、品種改良、微生物工業、バイオリアクターの開発などに幅広く利用できる可能性を有している。

10

【0004】

【非特許文献1】

Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., and Waterhouse, P. M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-320

【0005】

【非特許文献2】

Singh, S., Green, A., Stoutjesdijk, P., and Liu, Q. (2000). Inverted-repeat DNA: a new gene-silencing tool for seed lipid modification. *Biochem Soc Trans* 28, 925-927

20

【0006】

【非特許文献3】

Thijn R. Brummelkamp, Rene Bernards, Reuven Agami, 19 April 2002, A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells, *SCIENCE*, vol. 296, 550-553

30

【0007】

【非特許文献4】

Bourque, J. E., and Folk, W. R. (1992). Suppression of gene expression in plant cells utilizing antisense sequences transcribed by RNA polymerase III. *Plant Mol Biol* 19, 641-647

【0008】

【非特許文献5】

Murfett, J., Bourque, J. E., and McClure, B. A. (1995). Antisense suppression of S-RNase expression in *Nicotiana* using RNA polymerase II- and III-transcribed gene constructs. *Plant Mol Biol* 29, 201-212

40

【0009】

【非特許文献6】

Perriman, R., Bruening, G., Dennis, E. S., and Peacock, W. J. (1995). Effective

50

ribozyme delivery in plant cells. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 6175 - 6179

【0010】

【非特許文献7】

Ramamonjisoa, D., Kauffmann, S., Choisine, N., Marechal-Drouard, L., Green, G., Wintz, H., Small, I., and Dietrich, A. (1998). Structure and expression of several bean (*Phaseolus vulgaris*) nuclear transfer RNA genes: relevance to the process of tRNA import into plant mitochondria. Plant Mol Biol 36, 613 - 625

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

上記 dsRNA の細胞内への導入方法として、線虫などではマイクロインジェクションによる直接注入方法が頻繁に用いられている。一方、植物では、セルロースやペクチン質からなる強固な細胞壁が存在するため、dsRNA を細胞内へ直接導入することが極めて難しい。そのため、植物では転写後に dsRNA が形成されることを期待した逆方向反復塩基配列 (inverted repeat sequence) の構造を持つベクターで形質転換する方法が専ら利用されている。

【0012】

上記の方法においては通常、逆方向反復塩基配列の間、即ち標的遺伝子のセンス鎖配列とアンチセンス鎖配列との間に、スペーサーと呼ばれる RNA の二本鎖形成に関与しない配列が挿入される。これは、ベクター作製時用いられる大腸菌において、長いパ lindローム配列は安定に存在できないという理由から実施されるものである。近年、このスペーサーの部分を入ロントと置き換え、転写後にスプライシングによってこの部分が除かれるようにすると、遺伝子発現の抑制効率が上昇するとの報告がある (非特許文献1及び2参照)。

【0013】

ところで、RNA 干渉誘導ベクターは、mRNA の転写を担う RNA ポリメラーゼ II (以下 pol II と称する) の転写系を使用するのが従来一般的であったが、近年では、tRNA などの RNA ポリメラーゼ III (以下 pol III と称する) の転写系を用いた発現例が、哺乳類動物細胞において報告されており、特にリボザイムの動物細胞における発現で一定の効果を上げている (非特許文献3参照)。一方、植物細胞においても tRNA の下流にターゲット遺伝子のアンチセンス鎖やリボザイムを連結し、遺伝子発現抑制を試みた例がいくつか報告されている (非特許文献4~6参照)。

【0014】

しかしながら、植物におけるこのようなベクターの構築においては、遺伝子発現の抑制効率が必ずしも高くないことに加え、作製が面倒で時間がかかるという問題点を有している。そのため、何れの方法もほとんど普及していないのが現状である。

【0015】

そこで、本発明は、tRNA^{T^hr} をプロモーターとして使用することによって、遺伝子発現抑制効率がより高い新規 RNA 干渉誘導ベクター、その RNA 干渉誘導ベクターを用いて遺伝子発現抑制を効率よく行う方法、及びそのベクターが導入された形質転換体を提供する。

【0016】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するために、本願発明者等は、pol III の転写系の中でも特に tRNA に注目した。そして、本願発明者等は、tRNA の転写系は数百塩基以上の長い RNA の合成には向かないもののその転写量は pol II の系を上回ること、及び、

10

20

30

40

50

tRNA自身にプロモーターと細胞質移行シグナルが含まれるということから、インゲン (Phaseolus vulgaris) 由来の tRNA^{Thr} の転写系を利用してRNA干渉誘導ベクターの作製を試みた。その結果、植物細胞において、遺伝子発現抑制が効率よく行われるベクターを構築することに成功し、本発明を完成させるに至った。

【0017】

即ち、本発明に係るRNA干渉誘導ベクターは、遺伝子の遺伝情報をコードするセンス鎖配列と、そのアンチセンス鎖配列とが組み込まれ、逆方向反復塩基配列構造を有するRNA干渉誘導ベクターにおいて、RNAポリメラーゼIIIのプロモーター配列である tRNA^{Thr} がさらに組み込まれていることを特徴とするものである。即ち、上記RNA干渉誘導ベクターには、RNAポリメラーゼIIIのプロモーター配列である tRNA^{Thr} がプロモーターとして、上記逆方向反復塩基配列構造の上流域に組み込まれている。

10

【0018】

RNA干渉誘導ベクターとは、上述のRNA干渉現象を誘導させるために構築されたベクターである。このRNA干渉誘導ベクターは、遺伝子の遺伝情報をコードするセンス鎖配列とそのアンチセンス鎖配列とを含み、逆方向に相補的な逆方向反復塩基配列 (inverted repeat sequence) を有しているため、細胞内に導入され、その細胞内において転写されて形成された一本鎖のRNA同士は互いにハイブリッド結合し dsRNA を形成する。これによって、上記 dsRNA と相同な配列を有する遺伝子の発現を抑制することができる。

【0019】

また、RNAポリメラーゼIII (pol III) は、tRNA、5SrRNA、及びいくつかの他の小さな特定のRNAを合成する酵素である。上記tRNAは、このRNAポリメラーゼを認識するプロモーターの一つであるとともに、細胞質輸送シグナルとしての機能を果たす。

20

【0020】

そして、本発明のRNA干渉誘導ベクターには、上述の tRNA^{Thr} の中でも、特にインゲン由来の tRNA^{Thr} が組み込まれることが好ましい。なお、上記インゲン由来の tRNA^{Thr} は、配列番号1に示す塩基配列中の第20番目から第91番目の塩基配列を有するものであり、その詳細 (塩基配列、構造、取得方法、発現など) は、上記非特許文献7に記載の通りである。

30

【0021】

上述のように構築されたRNA干渉誘導ベクターは、tRNAの転写系を利用することで、その構築が簡便であるという利点を有しているとともに、高効率の転写、及び、転写産物の細胞質移行の向上によって、効率のよい遺伝子発現抑制を行うことができる。それゆえ、遺伝子の機能を解析するための手段として有用である。

【0022】

上記RNA干渉誘導ベクターは、植物であるインゲン由来の tRNA^{Thr} をプロモーターとして有していることから、植物細胞に導入されることが好ましい。これによれば、植物において高効率に遺伝子発現を抑制させることができ、植物中のある特定の遺伝子の機能を探るのに有用である。

40

【0023】

上記RNA干渉誘導ベクターは、大腸菌用発現ベクターである pUC18 であることが好ましい。これによれば、後述の実施例にも示されるように、より高い確率で遺伝子の発現を抑制させることができる。

【0024】

ところで、ベクター作製時に一般的に用いられる大腸菌において、上述のようなセンス鎖配列とアンチセンス鎖配列とが並列して含まれたパリンドローム配列は、安定に存在できない。それゆえ、上記RNA干渉誘導ベクターにおいて、上記センス鎖配列と上記アンチセンス鎖配列との間には、15bp以上50bp以下のスペーサー配列が設けられていることが好ましい。なお、近年、上記スペーサー配列の部分をイントロンと置き換え、転写

50

後にスプライシングによってこの部分が除かれるようにすると、遺伝子発現の抑制効果がより上昇するとの報告がなされている（非特許文献1及び2参照）。

【0025】

また、上記スペーサー配列は20bpからなることがより好ましく、このようなスペーサー配列として、例えば、配列番号1に示す塩基配列中の第135番目から第154番目までの配列を挙げることができる。

【0026】

上記RNA干渉誘導ベクターにおいて、tRNAの転写系があまり長いRNAの転写には向かないことを考慮すると、転写産物のトータルの配列長は300程度が上限である。そのため、上記センス鎖配列および上記アンチセンス鎖配列は、それぞれ20bp以上100bp以下であることが好ましい。また、上記センス配列として、発現抑制を行いたい遺伝子のスタートコドンの下流50~100bpを用いることが好ましく、5'および3'の非翻訳領域(UTR)は避けることが好ましい。

10

【0027】

上記RNA干渉誘導ベクターは、ターミネーター配列として、TTTTTTをさらに有することが好ましい。なお、上記Tとは、DNAを構成する4つの塩基のうちのチミンを意味する。従って、上記ターミネーター配列であるTTTTTTは、チミンが6塩基続く配列のことを意味している。

【0028】

本RNA誘導干渉ベクターは、上記ターミネーター配列を含むことによって、目的の領域を確実に発現させることができる。

20

【0029】

また、本発明に係る遺伝子発現抑制方法は、上記RNA干渉誘導ベクターを宿主細胞に導入することによって、上記宿主細胞内で遺伝子の発現を抑制させる方法である。

【0030】

この方法によれば、後述の実施例にも示されるように、従来のRNA干渉誘導ベクターを用いた遺伝子発現抑制方法と比較して、高効率に遺伝子の発現を抑制させることができる。そのため、遺伝子配列はわかっているが、機能が未知の遺伝子の生理的役割を解析するのに有用である。また、本方法は、強固な細胞壁を有するため、アンチセンス鎖配列を直接導入することによってRNA干渉誘導を行うことが困難な植物細胞において、特に有効に利用することができる。従って、上記宿主細胞は、植物細胞であることが好ましい。

30

【0031】

本発明には、上述のRNA干渉誘導ベクターが導入された形質転換体も含まれる。上記形質転換体は、RNA干渉誘導ベクターに含まれる遺伝子の発現が高効率に抑制されるため、その遺伝子の機能(生理的役割)の解析に有用であるとともに、医薬品として利用できる可能性を有している。

【0032】

上記形質転換体の宿主としては、上記RNA干渉誘導ベクターに含まれるプロモーターが植物由来のものであることから、植物(植物細胞を含む)であることが好ましい。これによれば、上記RNA干渉誘導ベクターに含まれる逆方向反復塩基配列を高効率で発現させ、二本鎖RNAを多く形成させることができるため、RNA干渉を強く誘導させることができると考えられる。また、植物細胞以外にも、インゲン由来のtRNA^{Trp}がHeLa細胞の各抽出液を用いて、*in vitro*で転写されることが確認されている(非特許文献7参照)ため、ヒトの培養細胞も宿主として利用可能である。

40

【0033】

【発明の実施の形態】

本発明について、以下により詳細に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

【0034】

1. RNA干渉誘導ベクターについて

50

本実施の形態においては、上記RNA干渉誘導ベクターの一例として、大腸菌用発現ベクターpUC18のEcoRI/HindIIIサイトにインゲン由来tRNA^{T^hr}とターミネーター配列(TTTTTT)とを含む合成RNAが挿入されたベクターを例に挙げて説明する。

【0035】

本実施の形態に係るRNA干渉誘導ベクター(RNAi誘導ベクターとも称する)のEcoRI/HindIIIサイトの構造を図1に模式的に示す。図1に示すように、上記RNAi誘導ベクターは、5'側のEcoRIサイトの近傍から順に、プロモーターであるtRNA^{T^hr}1、ターゲット配列であるセンス鎖配列(Target2)、スペーサー配列(Spacer3)、上記センス鎖配列のアンチセンス鎖配列(Target2')、ターミネーター配列4(TTTTTT)、HindIIIサイトが設けられている。そして、上記tRNA^{T^hr}1と上記target2との間には制限酵素(SpeI)サイトが設けられ、上記target2'と上記ターミネーター配列4との間には制限酵素(XhoI)サイトが設けられている。なお、上記ターゲット配列は、ある遺伝子の部分配列である。

10

【0036】

上記のような構造を有するRNAi誘導ベクターは、プロモーターであるtRNA^{T^hr}1をRNAポリメラーゼが認識することによって、tRNA^{T^hr}1配列の5'末端より転写を開始する。そして、上記RNAi誘導ベクターのTarget2から下流側の領域は、RNAポリメラーゼによってターミネーター配列4が認識されるまで順次転写される。それゆえ、この転写反応によって得られるmRNAは、ある遺伝子の部分配列のセンス鎖とアンチセンス鎖とが連結された構造を有する。従って、上記mRNAは、逆方向反復塩基配列構造を有しており、2本のmRNAが互いに相補的な構造であるため、ハイブリッド結合し2本鎖RNA(dsRNA)を形成する。

20

【0037】

上記dsRNAが細胞内で形成されれば、当該dsRNAと相同な配列を持つ遺伝子の発現を抑制するというRNA干渉を引き起こす。それゆえ、上記ターゲット配列として、配列が既知であるが、その機能が未知の遺伝子を用いてRNAi誘導ベクターの作製を行い、それを適当な宿主細胞に導入すれば、その遺伝子の発現のみが人為的に抑制された形質転換体を作製することができる。

30

【0038】

なお、上記スペーサー配列3は、RNAの二本鎖形成には関与しないが、ベクター作製時に用いられる大腸菌において、パリンドローム配列を安定化させるために有効である。なお、上記スペーサー配列として具体的には、配列番号1に示す塩基配列の第135番目から第154番目までの20bpの塩基配列を挙げることができるが、これに限定されるものではない。しかしながら、パリンドローム配列を安定化させるために、本実施例においては20bpのスペーサーを用いている。

【0039】

上記RNAi誘導ベクターの逆方向反復塩基配列(Target2、Spacer3、及びTarget2'からなる配列)として、例えば、配列番号1に示すものを挙げることができる。しかしながら、本発明に用いられるターゲット配列については、特に限定されることなく、その機能を解析したい目的の遺伝子の部分配列を用いればよい。

40

【0040】

続いて、上記RNAi誘導ベクターの作製方法について以下に説明する。

【0041】

上記RNAi誘導ベクターを作製するために使用することができるベクターとしては、従来から微生物や植物、植物細胞などの形質転換に使用されているベクターを挙げることができる。上記ベクターとして具体的には、プラスミド、ファージ、又はコスミドなどを挙げることができる。より具体的には、上述のpUC18、あるいはpUC19、pGEM-3Z(Promega)、pBI121などを挙げることができるが、これに限定される

50

ものではない。

【0042】

そして、上記ベクターを適当な制限酵素を用いて切断し、その切断部位にプロモーターとして上述のインゲン由来の tRNA^{T^hr} 1、及び、ターミネーターとしてTTTTTTを挿入すればよい。また、後述の実施例のように、tRNA^{T^hr} とターミネーターとの間にターゲット配列挿入用の制限酵素サイト（例えば、Spe I及びXho I）をあらかじめ挿入しておけば、この制限酵素サイトに逆方向反復塩基配列を容易に挿入することができる。

【0043】

また、上記ターミネーター配列としては、上述のTTTTTTに限定されることはなく、一般的に知られたターミネーター配列であるTが4つ以上連続した配列を用いることができる。

【0044】

上述のようにして作製されたRNAi誘導ベクターは、後述の実施例においても示されるように、従来のプロモーターである35Sプロモーターなどが組み込まれたRNAi誘導ベクターと比較して、高効率に遺伝子発現を抑制することができる。それゆえ、上記RNAi誘導ベクターに、目的とする遺伝子の部分配列をターゲット配列として組み込み、さらに、そのアンチセンス鎖配列も組み込むことによって、逆方向反復塩基配列を構成した後、植物細胞などの宿主細胞に導入することによって、当該宿主細胞内で目的とする遺伝子の発現を抑制させることができる。このようにして、特定の遺伝子の発現を抑制する方法は、機能が未知の遺伝子の機能の同定に利用することができる。

【0045】

2. 形質転換体

続いて、本発明の形質転換体について説明する。本発明の形質転換体は、上記RNAi誘導ベクターが導入されたものである。

【0046】

このような形質転換体の一例として、実施例に示すようなタバコ(Nicotiana glauca L. cv.)の培養細胞のプロトプラストを宿主として、エレクトロポレーション法によって上記RNAi誘導ベクターを導入したものを挙げるることができる。上記形質転換体に導入されるRNAi誘導ベクターは、ターゲット配列としてホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子の部分配列が挿入されている。そして、上記形質転換体は、上記RNAi誘導ベクターとともに、ホタルルシフェラーゼの全長遺伝子の発現ベクターが導入されており、コントロールと比較してルシフェラーゼの活性が有意に高効率に抑制されることが確認されている。従って、本発明に係るRNAi誘導ベクターが導入された上記形質転換体は、目的とする遺伝子の発現を高効率に抑制させることができる。

【0047】

本発明のRNAi誘導ベクターは、植物由来のプロモーターであるtRNA^{T^hr}を使用しているため、特に宿主を植物として導入することが好ましい。ここで、上記植物の範疇には、完全な植物のみならず、その一部、例えば、葉、種子、塊茎、挿木等も含まれるものとする。さらに、上記植物には、予め形質転換された遺伝子組み換え植物やその子孫を起源とする植物組織、プロトプラスト、細胞、カルス、器官、植物種子、胚芽、花粉、卵細胞、接合子などの増殖可能な植物材料；花、茎、実、葉、根などを含む植物の一部；等も含まれるものとする。

【0048】

また、上記形質転換体を作製する方法としては、上述のエレクトロポレーション法だけでなく、従来公知の種々の形質転換法を用いることができる。このような形質転換法として、具体的には、マイクロインジェクション法、弾道粒子加速法、プロトプラスト形質転換/再生法、アグロバクテリウムによる形質転換法などを挙げるることができる。また、上記形質転換方法は、宿主となる植物の種類（例えば、単子葉植物・双子葉植物）に応じて適宜選択されることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0049】

【実施例】

本実施例においては、*pol III*の転写系を利用したRNAi誘導ベクターの作製の一実施例として、ルシフェラーゼをターゲット遺伝子としたRNAiベクターの作製について説明する。さらに、本実施例においては、タバコBY-2培養細胞を宿主として用いて、上記RNAiベクターを導入した形質転換体の作製、及び、その形質転換体における遺伝子発現抑制効果の確認実験結果について説明する。

【0050】

1. タバコBY-2細胞の培養

タバコBY-2細胞 (*Nicotiana tobacum L. cv Bright Yellow-2*) は、改変LS培地 (1xMS medium、0.2g/L K_2HPO_4 、0.1g/L myo inositol、1mg/L thiamine-HCl、0.2mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and 30g/L sucrose、pH 5.8:MLSと命名) を用い、暗黒条件下、120rpmにて26℃で培養を行った。植え継ぎは、1週間毎に100mlの培地に対して5mlの割合で行った。

【0051】

2. プラスミドの構築

(1) ルシフェラーゼ発現ベクターの作製 (pPlucとpRluc)

CaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3'ベクターをSalI及びNotIで切断し、sGFP配列を取り除いた。このベクターにSalIサイト及びNotIサイトを付加したプライマーを用いて、PCRにより増幅したホタルルシフェラーゼ (Pluc) 及びウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) の配列を挿入した。PCRの鋳型には、pGL3-Basic vector (Promega) 及びpRL-CMV vector (Promega) を用いた。

【0052】

ここで作製されたルシフェラーゼ発現ベクターのうち、ホタル (*Photinus pyralis*) 由来ルシフェラーゼ (Pluc) の配列が組み込まれたものをpPlucと称し、ウミシイタケ (*Renilla reniformis*) 由来ルシフェラーゼ (Rluc) の配列が組み込まれたものをpRlucと称する。

【0053】

(2) tRNA転写系のプロモーター (tRNA^{Thr}) が組み込まれたベクター (tRNA promoter vectors: ptPluc37とptGFP37) の作製
 先ず、大腸菌用発現ベクターpUC18のEcoRI/HindIIIサイトにインゲン由来tRNA^{Thr}とターミネーター配列 (TTTTTT) を含む合成RNAを挿入した。tRNAとターミネーターとの間には、ターゲット配列挿入用の制限酵素サイト (SpeI及びXhoI) をあらかじめ挿入しておいた。次に、tRNAとターミネーター配列との間に存在するSpeI/XhoIサイトにホタル由来ルシフェラーゼの部分配列を含む逆方向反復塩基配列 (inverted repeat配列) を挿入した。このとき、ターゲット配列の長さ (転写後に二本鎖を形成すると期待される部分の長さ) は37塩基、スペーサーの長さは20塩基とした。

【0054】

上述のようにして構築されたRNAi誘導ベクター (ptPluc37と称する) であるpUC18のEcoRI/HindIIIサイトの模式図は、図1に示す通りである。また、このptPluc37のEcoRI/HindIIIサイトの塩基配列は配列番号1及び図3に示す通りである。この配列は、その配列中の第98番目から134番目までの37bpがターゲット配列であるセンス鎖配列 (Target 2)、第135番目から第154番目までの20bpがスペーサー配列 (Spacer 3)、第155番目から第191番目までの37bpが上記センス鎖配列のアンチセンス鎖配列 (Target 2') である。なお、上記ターゲット配列は、配列番号3に示すホタルルシフェラーゼ

遺伝子のORFの塩基配列の128番目から164番目に相当する。

【0055】

配列特異性を確認するためのコントロールとして、sGFP(S65T)の逆方向反復塩基配列(inverted repeat配列)を含むベクター(ptGFP37と称する)も作製した。このptGFP37のEcoRI/HindIIIサイトの塩基配列は配列番号2及び図4に示す通りである。なお、ターゲット配列(Target2に相当する配列)は、配列番号4に示すsGFP(S65T)遺伝子のORFの塩基配列の126番目から162番目に相当する。

【0056】

なお、図3及び図4に示す各ベクターのEcoRI/HindIIIサイトの塩基配列において、図中のa、b、c、d、e、f、g、h、iで示す各配列は、それぞれ順に、EcoRIサイト、72bpからなるインゲン由来のtRNA^{Thr}、SpeIサイト、37bpからなるdsRNA領域(センス側)、20bpからなるスペーサー配列、37bpからなるdsRNA領域(アンチセンス側)、XhoIサイト、ターミネーター配列、HindIII配列である。

10

【0057】

また、本実施例において作製された各ベクターptPluc37、ptGFP37におけるスペーサー配列は、それぞれホタルルシフェラーゼ遺伝子あるいはsGFP(S65T)のターゲット配列のセンス鎖に由来するものである。より詳しくは、ptPluc37におけるスペーサー配列は、配列番号3に示す塩基配列中の第165番目から第184番目に相当する塩基配列を有するものである。つまり、センス鎖がアンチセンス鎖に比べて20bp長くなっており、この20bpの2本鎖形成に関与しない余分な配列がスペーサー配列となっている。

20

【0058】

(3) コントロールとしてのCaMVの35Sプロモーターが組み込まれたベクター(35S promoter vector: p35SPluc37とp35SGFP37)の作製

tRNA promoter vectorsのコントロールとして、CaMVの35Sプロモーターを含むベクターも作製した。CaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3'ベクターをSalI/NotIで切断した後、SpeIサイト及びXhoIサイトを含有リンカーを挿入した。次に、このベクターをSpeI/XhoIで切断した後、tRNA promoter vectorの場合と同様に、ホタル由来のルシフェラーゼ及びsGFP(S65T)の部分配列を含むinverted repeat配列を挿入した。二本鎖形成領域及びスペーサーの長さ、そしてターゲットの領域はtRNA promoter vectorの場合と同じとした。

30

【0059】

ここで作製されたベクターのうち、ホタル由来のルシフェラーゼの部分配列が組み込まれたものをp35SPluc37と称し、sGFP(S65T)の部分配列が組み込まれたものをp35SGFP37と称する。

【0060】

40

3. BY-2プロトプラストの調製

植え継ぎ3日後のBY-2培養細胞懸濁液50mlをファルコンチューブに移し、1000rpm(400×g)で3分間遠心して上清を除いた。プロトプラスト洗浄液(0.4Mのマンニトールを添加した5mM MESバッファー、pH5.8)で1回洗浄した後、酵素液(1% Cellulase Onozuka RS、0.1% Pectolyase Y-23、5mM Mannitol、pH5.5)を沈殿した培養細胞に30ml加え、30で1時間緩やかに(60rpm)振とうした。800rpm(70×g)で3分間遠心して酵素液を除いた後、プロトプラスト洗浄液で1回洗浄し、BY-2プロトプラストを得た。

【0061】

50

4. エレクトロポレーション法を用いたプラスミドの導入（形質転換体の作製方法）

上記BY-2プロトプラストをEPバッファー（5 mM MES、70 mM KCl、0.3 M mannitol、pH 5.8）で2回洗浄した。氷冷した0.4 cm幅のキュベットに700 micro-Lのプロトプラスト懸濁液とプラスミド（0.3 μg pPluc + 0.3 μg pRluc + 3 μg RNAi vector）を加え、10分間氷冷した。緩やかなピペティングで攪拌したのちキュベットを装置（Shimadzu）にセットし、電気パルス（300 V、150 μF、1回）をかけた。10分間氷冷した後、エレクトロポレーション産物300 μl（約 1.5×10^6 個）を12穴プレートに移し、1% sucroseと0.4 M Mannitolを添加したMLSを2.7 ml加え、25℃で24時間遮光下で静地培養した。

10

【0062】

5. 2つのルシフェラーゼ活性測定（Dual luciferase assay）

BY-2プロトプラストを遠心で回収した後、上清を除き、1×Passive Lysis buffer（Promega）を100 μl加えた。緩やかなボルテックスにより細胞を溶解させ、そのまま室温で5分間放置した。この細胞溶解液10 micro-Lをルミノメーター（Turner Designs TD-20/20 Lumimeter）にセットし、測定を開始した。

6. ルシフェラーゼ活性測定の結果及び考察

ptPluc37、p35Spluc37の各RNAi誘導ベクターは、上述の形質転換体の作製方法に基づいて、ルシフェラーゼ発現ベクター（pPluc、pRluc）とともにBY-2プロトプラストに導入され、形質転換体を作製された。これらの形質転換体について、上述の活性測定方法に基づいて、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。

20

【0063】

その結果を、以下の表1ないし表4、及び図2に示す。

【0064】

【表1】

サンプル名	Pp-Luc	Rr-Luc	Ratio (Pp-Luc/Rr-Luc)
Blank-1	0.028	3.607	0.008
Blank-2	0.017	3.786	0.004
Blank-3	0.017	4.204	0.004
ptPluc37-1	12.160	9.420	1.291
ptPluc37-2	9.605	8.307	1.156
ptPluc37-3	8.936	7.181	1.244
ptGFP37-1	40.570	7.313	5.548
ptGFP37-2	39.370	6.331	6.219
ptGFP37-3	29.120	5.931	4.910
p35Spluc37-1	42.590	7.315	5.822
p35Spluc37-2	30.570	5.793	5.277
p35Spluc37-3	27.820	5.927	4.694
p35SGFP37-1	61.200	7.217	8.480
p35SGFP37-2	54.950	6.680	8.226
p35SGFP37-3	43.290	6.796	6.370

30

40

【0065】

【表2】

サンプル名	Pp-Luc	Rr-Luc
Blank	0.021	3.866
ptPluc37	10.234	8.303
ptGFP37	36.353	6.525
p35SPluc37	33.660	6.345
p35SGFP37	53.147	6.898

【 0 0 6 6 】

【 表 3 】

サンプル名	Pp-Luc	Rr-Luc	Ratio (Pp-Luc/Rr-Luc)
ptPluc37	10.213	4.437	2.302
ptGFP37	36.332	2.659	13.664
p35SPluc37	33.639	2.479	13.570
p35SGFP37	53.126	3.032	17.524

10

【 0 0 6 7 】

【 表 4 】

サンプル名	相対活性
ptGFP37 (Control)	100
ptPluc37	16.84641146
p35SGFP37 (Control)	100
p35SPluc37	77.43612386

20

【 0 0 6 8 】

各表に示すサンプル名はそれぞれ、Blank：ブランク（RNAi vector 導入せず）、ptPluc37：ptPluc37（本発明のRNAi vector）とルシフェラーゼ発現ベクター（pPluc及びpRluc）が導入されたもの、ptGFP37：ptGFP37（コントロール）とルシフェラーゼ発現ベクター（pPluc及びpRluc）が導入されたもの、p35SPluc37（比較用のための従来のRNAi vector）とルシフェラーゼ発現ベクター（pPluc及びpRluc）が導入されたもの、p35SGFP37（コントロール）とルシフェラーゼ発現ベクター（pPluc及びpRluc）が導入されたもの、を意味する。また、各表において、Pp-Lucはホタル由来ルシフェラーゼの活性、Rr-Lucはウミシイタケ由来ルシフェラーゼの活性を示し、Ratio (Pp-Luc / Rr-Luc) は各Rr-Lucに対する各Pp-Lucの割合を示す。

30

【 0 0 6 9 】

なお、表1に示すように、同種のサンプルはそれぞれ3個ずつ調製され、活性の測定が行われ、表2にはその各平均値を示す。さらに表3は、表2に示す各平均値から対応するBlankの数値を引いたもの、を示し、Ratio (Pp-Luc / Rr-Luc) は、ここで得られた各Rr-Lucの値に対する各Pp-Lucの値の割合を示す。また、表4には、各RNAi誘導ベクターを用いた場合のコントロールに対する相対活性を示す。そして、図2は表4に示す結果をグラフで表したものであり、(a)には、ptGFP37（コントロール）及びptPluc37の相対活性（%）を、(b)には、p35SGFP37（コントロール）及びp35SPluc37の相対活性（%）を示す。

40

【 0 0 7 0 】

図2(a)に示すように、tRNA^{T^{hr}}付きのRNAi誘導ベクターであるptPluc37を導入したもので最も活性が低く、コントロール（GFPをコードするRNAi誘導ベクター、即ち、ptGFP37に対する相対活性は約20%であった。

【 0 0 7 1 】

50

一方、35Sプロモーターの構築(p35Sp1uc37)では、図2(b)に示すように、その相対活性が約80%と、tRNA^{T^hr}付きの構築に比べ約60%高かった。この結果から、本実施例にて作成したtRNA^{T^hr}付きのRNAi誘導ベクターは、従来の構築に比べRNAi誘導能が高いことが示された。

【0072】

この高いRNAi誘導能は、tRNA^{T^hr}の高いプロモーター活性に加え、tRNA^{T^hr}の細胞質移行シグナルとしての機能によるものであると考えられる。細胞質移行シグナルとしてのtRNA^{T^hr}の有効性は、動物細胞においてmRNAを切断するリボザイムで既の実証されている(非特許文献3参照)。従来のpol I Iの転写系を用いた構築では、逆方向反復塩基配列の間、即ちセンス鎖配列とアンチセンス鎖配列との間のスパーサーをイントロンと置き換えると、RNAi誘導能が上昇すると報告されている(非特許文献1及び2参照)。この理由は不明であるが、mRNAの核から細胞質への効率的な輸送にスプライシングのステップが必要であると報告されていることから、核内で生成したアンチセンス鎖RNAの細胞質への移行効率がRNAi誘導能の移行に大きな影響を及ぼすと考えられる。従って、本実施例の結果は、tRNA^{T^hr}が細胞質移行シグナルとして機能することによって、RNAiが起こる場であると考えられている細胞質におけるアンチセンス鎖RNAの濃度が上昇し、その結果RNAiがより強く起こったことを示しているものと思われる。

10

【0073】

【発明の効果】

以上のように、本発明のRNA干渉誘導ベクターは、遺伝子の遺伝情報をコードするセンス鎖配列と、そのアンチセンス鎖配列とが組み込まれ、逆方向反復塩基配列構造を有するRNA干渉誘導ベクターにおいて、RNAポリメラーゼI I Iのプロモーター配列であるtRNA^{T^hr}がさらに組み込まれていることを特徴とするものである。

20

【0074】

上記RNA干渉誘導ベクターは、上述の実施例に示す結果からもわかるように、植物細胞において従来の35Sプロモーターなどによってドライブされるベクターに比べ、ある特定の遺伝子発現を高効率に抑制させることができる。さらに、上記RNA干渉誘導ベクターは、作製も簡便に行えるという利点も有している。

【0075】

RNA干渉誘導ベクターは、その機能が未知の遺伝子の機能同定に非常に有用なツールであることから、本発明のRNA干渉誘導ベクターは、植物細胞におけるRNA干渉誘導ベクターとして高い利用価値を有している。さらに、上記RNA干渉誘導ベクターを植物へ導入し形質転換体を作製するという植物の機能改変への応用も期待できる。

30

【0076】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The head of Kyoto University

<120> Novel RNA-interference inductive vectors, the methods that
can suppress gene expression by using the vectors,
and the mutants in which the vector is inserted

<130> U2002P185

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 209

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Vector Sequence

<400> 1

```

gaattcaaac tatcaacaag cccttatagc tcagtggtag agcgtcagtc ttgtaaactg 60
aaggtcctga gttcgatcct gcgtgagggc aactagtcag atgcacatat cgagggtggac 120
atcacttacg ctgagtactt cgaaatgtcc gtctcagcg taagtgaigt ccacctgat 180
atgtgcatct gctcgagttt ttttaagctt                                209

```

10

20

30

40

<210> 2

<211> 209

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Vector Sequence

10

<400> 2

gaattcaaac tatcaacaag cccttatagc tcagtggtag agcgtcagtc ttgtaaactg 60
aaggiccgtg gttcgatcct gcgtgagggc aactagtgtc gacctgaag ttcattcgca 120
ccaccggcaa gctgacctat ttgtttattt ttctcagctt gccgggtggg cagatgaact 180
tcagggtcag cctcgagttt ttttaagctt 209

20

<210> 3

<211> 1653

<212> DNA

<213> *Photinus pyralis*

30

<400> 3

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatccgct ggaagatgga 60
accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatagc ccctgggtcc tggaacaatt 120
gcttttacag atgcacatat cgaggctggac atcacttacg ctgagtactt cgaaatgtcc 180
gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240
tgcagtgaag actctcttca attctttatg ccgggtgttg gcgcttatt tatcggagtt 300
gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgggcatt 360

40

tcgcagccta ccgiggigt cgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatit gaacgtgcaa 420
 aaaaagctcc caatcatcca aaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccagga 480
 tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatcagat 540
 tttgtgccag agtccttcga tagggacaag acaattgcac tcatcatgaa ctctcttgga 600
 tctactggtc tgcctaaagg tgtcgcctcg cctcatagaa ctgccctcgt gagattctcg 660
 catgccagag atcctatitit tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat ttttaagtgtt 720
 gtccatcc atcacggitit tggaatgtit actacactcg gatattgat atgtggattit 780
 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgttct tgaggagcct tcaggattac 840
 aagattcaaa gtgcgctgct ggtgccaacc ctattctct tcttcgcaa aagcactctg 900
 attgacaaat acgatttate taatttacac gaaattgctt ctgggtggcgc tccccctct 960
 aaggaagtcg ggggaagcgtt tgcgaagagg ttccatctgc caggtatcag gcaaggatat 1020
 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccg agggggatga taaaccgggc 1080
 gcggtcggta aagtgttcc atttttgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa 1140
 acgctgggcg ttaatcaaag aggcgaactg tgtgtgagag gtcttatgat tatgtccggt 1200
 taigtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttctca tcgttgaccg cctgaagtct 1320
 ctgattaagt acaaaggcta tcagggtggct cccgctgaat tggaatccat ctigtctcaa 1380
 caccacaaca tcttcgacgc aggtgtcgca ggtcttccc acgatgacgc cggatgaactt 1440
 cccgccgccg tigtgtitit ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagtgtcgcg gaggagtigt gtttgtggac 1560
 gaagtaccga aaggcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatctcata 1620
 aaggccaaga agggcggaaa gatcgccgtg taa 1653

10

20

30

<210> 4

<211> 720

<212> DNA

<213> *Renilla reniformis*

40

<400> 4

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccaccttggg cgagctggac 60
 ggcgacgiga acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagciga cccitgaagt cactctgcacc accggcaagc tgcctgtgcc ctggcccacc 180
 ctctgigacca ccttcaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccca ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggatga agttcgaggg cgacaccttg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatcaagg tgaacttcaa gateccgcc aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgcctgtgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actcacggca tggacgagct gtacaagtaa 720

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のRNA干渉誘導ベクターの一例であるpUC18を用いたtRNA promoter vectorのEcoRI/HindIIIサイトを示す模式図である。

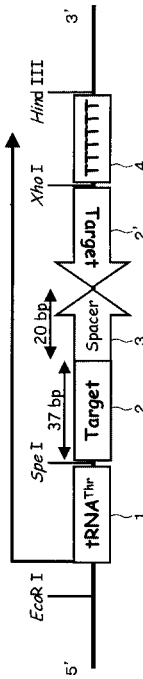
【図2】本発明の実施例にてルシフェラーゼ活性測定を行った結果を、グラフで表したものであり、(a)は、ptGFP37(コントロール)及びptPluc37の相対活性(%)を、(b)は、p35SGFP37(コントロール)及びp35Spluc37の相対活性(%)を示している。

【図3】本実施例で作製したベクターptPluc37のEcoRI/HindIIIサイトの塩基配列を示す模式図である。

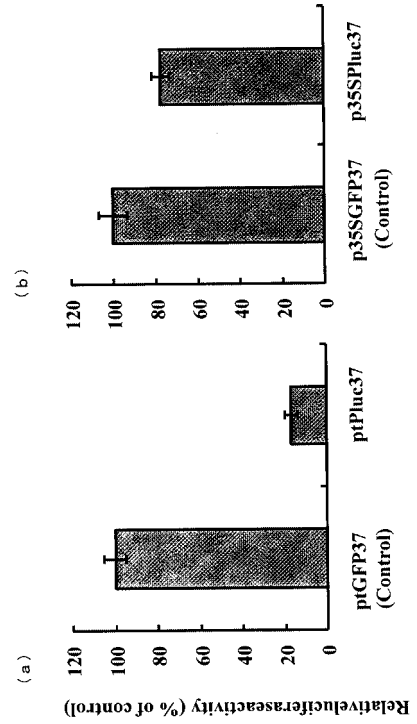
30

【図4】本実施例で作製したベクターptGFP3のEcoRI/HindIIIサイトの塩基配列を示す模式図である。

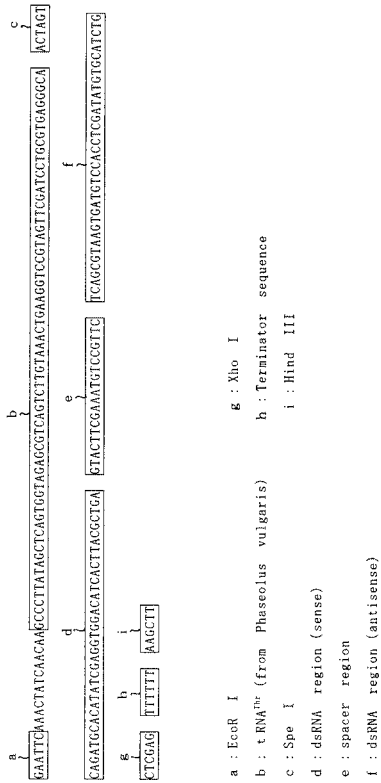
【 図 1 】



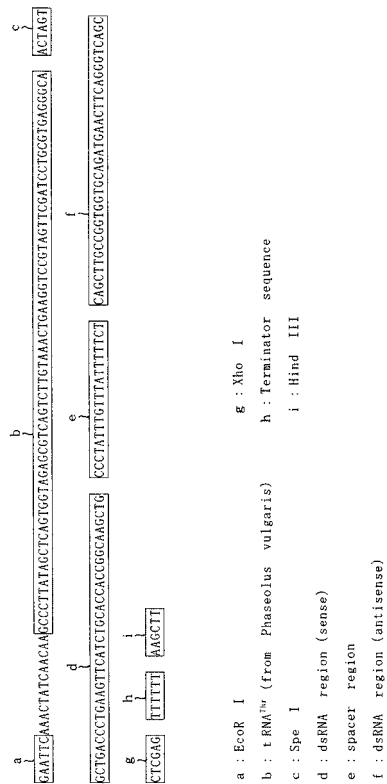
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA08 AA20 CA01 DA01 FA01 FA07 FA20 GA11 HA20
4B065 AA88X AB01 AC20 BA02 CA53