

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-290084

(43) 公開日 平成11年(1999)10月26日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
		7/00
		C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 5/00 B
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	

審査請求 有 請求項の数10 F D (全 5 頁) 最終頁に続く

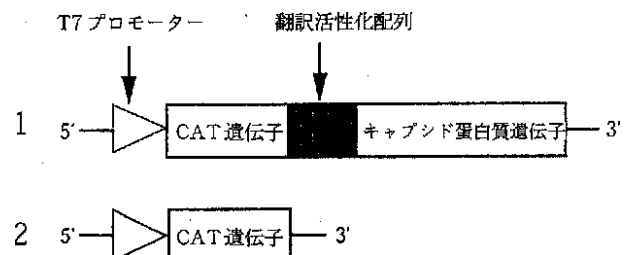
(21) 出願番号	特願平10-114428	(71) 出願人	391030284 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長 茨城県つくば市大わし1-2
(22) 出願日	平成10年(1998)4月10日	(72) 発明者	中島 信彦 茨城県つくば市春日1-11-4-205-401
		(72) 発明者	佐々木 潤 茨城県つくば市稲荷前17-6 沼尻ハイツ A101
		(74) 代理人	弁理士 葛和 清司 (外1名)

(54) 【発明の名称】 蛋白質への翻訳活性を促進するDNAおよび該DNAを用いて蛋白質遺伝子から効率よく蛋白質を合成させる方法

(57) 【要約】

【解決しようとする課題】 必要量の発現蛋白質の合成を促進し、かつ外来遺伝子発現法として近年多く利用されているバキュロウィルス発現系の宿主細胞である昆虫細胞で機能し得る翻訳活性塩基を見出し、目的とする蛋白質を効率よく生産する。

【解決手段】 昆虫RNAウイルス、とくにP S I Vの遺伝子塩基配列中の翻訳活性を促進する塩基配列に対応するDNAをプラスミド中に取り込むことにより、その下流に位置する蛋白質遺伝子から効率よく蛋白質を合成させる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】昆虫 RNA ウィルスに由来する、キャプシド蛋白質遺伝子上流の配列に含まれる翻訳活性を促進する RNA 塩基配列に対応する DNA。

【請求項 2】昆虫ウィルスがチャバネアオカメムシ（学名：*Plautia stali*）から分離された P S I V（*Plautia stali intestine virus*）であることを特徴とする、請

```
GTATTCTAGA TTGTATGAAT TGGCAAAGAT CTGGAGAGGA TGAAGGATTG AATGCTCAAG
CAAACGTTAG CTTTGCTTTA AAGGAATTAT CTCTCCACCC CGAGGATGTG TGGGACCACT
GGTTTCCCCT CATTCTCAGA GCATGTAATA AACACGGTGT CGAAGTAGAA TTTCTATCTC
GACACGCGGC CTTCCAAGCA GTTAGGAAA CCGACTTCTT TGAAGAAGAA AGCTGACTAT
GTGATCTTAT TAAAATTAGG TTAATTTTCG AGGTTAAAA TAGTTTTAAT ATTGCTATAG
TCTTAGAGGT CTTGTATATT TATACTTACC ACACAAGATG GACCGGAGCA GCCCTCCAAT
ATCTAGTGTA CCCTCGTGCT CGCTCAAACA TTAAGTGGTG TTGTGCGAAA AGAATCTCAC
TTCAAGAAAA
```

【請求項 5】請求項 1～4 のいずれかに記載の DNA 塩基配列の下流に、目的の蛋白質を合成させる遺伝子を有することを特徴とするプラスミド。

【請求項 6】請求項 1～4 のいずれかに記載の DNA 塩基配列が、プロモーター配列と目的遺伝子の翻訳開始点との間に挿入されていることを特徴とするプラスミド。

【請求項 7】請求項 5 又は 6 に記載のプラスミドが宿主細胞に導入された形質転換体。

【請求項 8】請求項 1～4 のいずれかに記載の DNA 塩基配列の下流に、目的の蛋白質を合成させる遺伝子を有することを特徴とする組換えバキュロウィルス。

【請求項 9】請求項 1～4 のいずれかに記載の DNA 塩基配列が、プロモーター配列と目的遺伝子の翻訳開始点との間に挿入されていることを特徴とする組換えバキュロウィルス。

【請求項 10】請求項 5 又は 6 に記載の組換えバキュロウィルスに感染した培養細胞。

【請求項 11】培養細胞がバキュロウィルス発現系の昆虫細胞であることを特徴とする、請求項 10 に記載のウィルス感染細胞。

【請求項 12】昆虫 RNA ウィルスの遺伝子塩基配列中の翻訳活性を促進する塩基配列に対応する DNA をプラスミド中に取り込むことにより、その下流に位置する蛋白質遺伝子から効率よく蛋白質を合成させる方法。

【請求項 13】昆虫ウィルスがチャバネアオカメムシから分離された P S I V であることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、新規な翻訳活性化塩基配列を有する DNA に関する。本発明はまた、該 DNA 塩基配列の下流に有効な蛋白質を合成させる目的遺伝子を有するプラスミド又は組換えウィルス、及び該プラスミドを含む形質転換体又は該組換えウィルスに感染した培養細胞に関する。更に本発明は、昆虫ウィルスの

請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 3】P S I V ゲノムの 5' 側から 5771～6200 塩基目に対応することを特徴とする、請求項 2 に記載の DNA。

【請求項 4】下記に示される翻訳活性化塩基配列を有する DNA。

翻訳活性を促進する塩基配列に対応する DNA をプラスミド中に取り込むことにより、その下流に位置する蛋白質遺伝子から効率よく蛋白質を合成させる方法に関する。

【0002】

【従来技術】ベクターに組み込まれた外来遺伝子を培養細胞や昆虫体内で発現させる手法は、遺伝子工学を利用して蛋白質を生産する場合に必要な不可欠である。しかし、組み込まれた遺伝子によっては、必要量の発現蛋白質を得られない場合も多い。USP 4937190 において、脊椎動物の RNA ウィルス、encephalomyocarditis virus (EMCV) のゲノム 5' 側の非翻訳領域に翻訳活性を促進する塩基配列が記載されている。しかしながら EMCV は細胞内でウィルスにとって少量しか合成する必要のない非構造蛋白質とキャプシド蛋白質を一つのポリ蛋白質として合成するために、十分な翻訳促進活性は得られない。さらに、EMCV は脊椎動物を宿主としているために、外来遺伝子発現法として近年多く利用されているバキュロウィルス発現系の宿主細胞である昆虫細胞ではほとんど機能しないため、実用上問題がある (Polkinghorne, I., and Roy, P. (1995) *Nucleic Acids Research* Vol. 23, 188-191)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従って、昆虫細胞で機能する翻訳活性を促進する塩基配列の発見が強く望まれている。即ち、本発明の課題は、必要量の発現蛋白質の合成を促進し、かつ外来遺伝子発現法として近年多く利用されているバキュロウィルス発現系の宿主細胞である昆虫細胞で機能し得る翻訳活性塩基を見出し、目的とする蛋白質を効率よく生産することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者は、前記の課題を解決するため、昆虫細胞で機能する可能性が高い、昆虫ウィルスの遺伝子塩基配列中から、翻訳活性を促進する塩基配列を見出すべく鋭意研究を重ねる中で、新規昆

虫ウイルスである、チャバネアオカメムシ（学名：Plautia stali）から分離されたP S I V（Plautia stali intestine virus）に由来する遺伝子塩基配列中から翻訳活性を促進する塩基配列を見出し、本発明を完成した。

【0005】本発明によるDNAは蛋白質の翻訳時に必要なりボソームをRNA上に効率的に取り込むことにより、その下流に位置する遺伝子から効率よく蛋白質を合成させる機能を持つ。しかも本発明によるDNAにより、RNAにキャップ構造がついていない場合にも効率よく蛋白質を合成できることが判明した。即ち、本発明は、キャプシド蛋白質遺伝子、とくにチャバネアオカメムシ（学名：Plautia stali）から分離されたP S I V（Plautia stali intestine virus）ウイルスに由来するキャプシド蛋白質遺伝子の上流の配列に含まれる塩基配列に対応する新規な翻訳活性化DNAに関する。

【0006】また本発明は、該DNA塩基配列の下流に有効な蛋白質を合成させる目的遺伝子を有するプラスミド及び組換えウイルスに関する。更に本発明は、該プラスミドを含む形質転換体及び該組換えウイルスに感染した培養細胞にも関する。

【0007】また本発明は、昆虫ウイルス、とくに前記P S I Vの遺伝子塩基配列中の翻訳活性を促進する塩基配列に対応するDNAをプラスミド又は組換えウイルス中に取り込むことにより、その下流に位置する蛋白質遺伝子から効率よく蛋白質を合成させる方法に関する。

【0008】本発明のP S I V由来の塩基配列は、そのゲノム構造が前記E M C Vのものとは異なり、ウイルス増殖時に多量に合成する必要があるキャプシド蛋白質を非構造蛋白質とは独立して合成するための専用の翻訳促進配列を持っている。従って、P S I VのものはE M C Vのものよりも強い翻訳促進活性を持っていると期待できる。

【0009】本発明によるDNAを、発現ベクターから配列

```
GTATTCCTAGA TTGTATGAAT TGGCAAAGAT CTGGAGAGGA TGAAGGATTG AATGCTCAAG
CAAACGTTAG CTTTGCTTTA AAGGAATTAT CTCTCCACCC CGAGGATGTG TGGGACCGAGT
GGTTTCCCCT CATTCTCAGA GCATGTAATA AACACGGTGT CGAAGTAGAA TTTCTATCTC
GACACGCGGC CTTCCAAGCA GTTAGGGAAA CCGACTTCTT TGAAGAAGAA AGCTGACTAT
GTGATCTTAT TAAAATTAGG TTAATTTTCG AGGTTAAAA TAGTTTTAAT ATTGCTATAG
TCTTAGAGGT CTTGTATATT TATACTTACC ACACAAGATG GACCGGAGCA GCCCTCCAAT
ATCTAGTGTA CCCTCGTGCT CGCTCAAACA TTAAGTGGT TGTGCGGAAA AGAATCTCAC
TTCAAGAAAA
```

【図面の簡単な説明】

【図1】翻訳活性の検出に使用したDNA鋳型の模式図。

RNAを転写する際にRNAポリメラーゼによって認識されるプロモーター配列と目的遺伝子の翻訳開始点との間に挿入しておく、翻訳活性化塩基配列を5'側に持つmRNAが合成され、それから蛋白質を合成する際にリボソームを効率よく利用することができ、結果として目的とする遺伝子産物をより多く発現させることができる。なお、本発明による翻訳活性化塩基配列を有するDNAは、該DNAを外来遺伝子として組み込んだプラスミドが導入された大腸菌（寄託番号、FERM P-16715）から容易に入手することができる。

【0010】

【実施例】大腸菌のファージに由来するT7 RNAポリメラーゼが認識するプロモーター配列の下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子を挿入し、さらにその下流にP S I Vの翻訳促進配列とキャプシド蛋白質遺伝子を接続したベクターを構築した（図1）。このプラスミドからT7 RNAポリメラーゼでRNAを合成し、そのRNAを用いてウサギの網状赤血球ライセートで*in vitro* translationを行った。その翻訳産物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した（図2，レーン1）。対照実験のCAT遺伝子の（レーン2）の場合と比較すると、CAT（25 kDa）は殆ど合成されず、翻訳活性化配列の下流にあるキャプシド蛋白質遺伝子から大量の蛋白質（39 kDa）が合成されている。

【0011】

【配列表】

配列の数：1

配列番号：1

配列の長さ：430

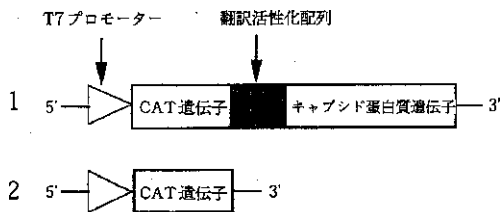
配列の型：核酸

起源：P S I V

ゲノム内での位置：5'側から5771-6200

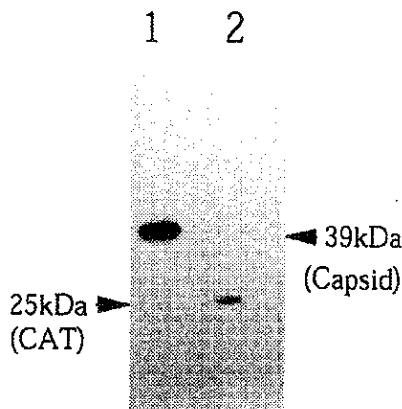
【図2】それらから転写したRNAを用いた*in vitro* translationの結果（写真）。

【図 1】



【図 2】

図面代用写真



【手続補正書】

【提出日】平成 11 年 2 月 12 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】下記に示される翻訳活性化塩基配列を有する DNA。

GTATTCTAGA	TTGTATGAAT	TGGCAAAGAT	CTGGAGAGGA	TGAAGGATTG	AATGCTCAAG
CAAACGTTAG	CTTTGCTTTA	AAGGAATTAT	CTCTCCACCC	CGAGGATGTG	TGGGACCAGT
GGTTTCCCCT	CATTCTCAGA	GCATGTAATA	AACACGGTGT	CGAAGTAGAA	TTTCTATCTC
GACACGCGGC	CTTCCAAGCA	GTTAGGGAAA	CCGACTTCTT	TGAAGAAGAA	AGCTGACTAT
GTGATCTTAT	TAAAATTAGG	TTAAATTTTCG	AGGTAAAAA	TAGTTTTAAT	ATTGCTATAG
TCTTAGAGGT	CTTGTATATT	TATACTTACC	ACACAAGATG	GACCGGAGCA	GCCCTCCAAT
ATCTAGTGTA	CCCTCGTGCT	CGCTCAAACA	TTAAGTGGTG	TTGTGCGAAA	AGAATCTCAC
TTCAAGAAAA					

【請求項 2】請求項 1 に記載の DNA 塩基配列の下流に、目的の蛋白質を合成させる遺伝子を有することを特徴とするプラスミド。

【請求項 3】請求項 1 又は 2 に記載の DNA 塩基配列が、プロモーター配列と目的遺伝子の翻訳開始点との間に挿入されていることを特徴とするプラスミド。

【請求項 4】請求項 2 又は 3 に記載のプラスミドが宿主細胞に導入された形質転換体。

【請求項 5】請求項 1 に記載の DNA 塩基配列の下流に、目的の蛋白質を合成させる遺伝子を有することを特徴とする組換えバキュロウイルス。

【請求項 6】請求項 1 に記載の DNA 塩基配列が、プロモーター配列と目的遺伝子の翻訳開始点との間に挿入されていることを特徴とする組換えバキュロウイルス。

【請求項 7】請求項 5 又は 6 に記載の組換えバキュロウイルスに感染した培養細胞。

【請求項 8】培養細胞がバキュロウイルス発現系の昆虫細胞であることを特徴とする、請求項 7 に記載のウイルス感染細胞。

【請求項 9】昆虫 RNA ウイルスの遺伝子塩基配列中の翻訳活性を促進する塩基配列に対応する DNA をプラスミド中に取り込むことにより、その下流に位置する蛋白

質遺伝子から効率よく蛋白質を合成させる方法。
【請求項10】昆虫ウイルスがチャバネアオカメムシか

ら分離されたP S I Vであることを特徴とする、請求項
9に記載の方法。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 R 1:92)		
(C 1 2 N 5/10		
C 1 2 R 1:91)		
(C 1 2 N 7/00		
C 1 2 R 1:92)		
(C 1 2 P 21/02		
C 1 2 R 1:91)		