

(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2004-321079

(P2004-321079A)

(43) 公開日 平成16年11月18日(2004.11.18)

(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	2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00	A 0 1 H 5/00 A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/78	A 6 1 K 35/78 U	4 B 0 6 5
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	4 C 0 8 8
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00 C	
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 36 頁)		

(21) 出願番号	特願2003-120639 (P2003-120639)	(71) 出願人	501167644 独立行政法人農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(22) 出願日	平成15年4月24日 (2003. 4. 24)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	高岩 文雄 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内
		(72) 発明者	高木 英典 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内
		Fターム(参考)	2B030 AA02 AB03 AD08 AD20 CA14 CA19 CB02
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アレルゲン特異的T細胞抗原決定基を植物へ集積させる方法、および該抗原決定基を集積させた植物

(57) 【要約】

【課題】 アレルゲン特異的ヒトT細胞エピトープを植物へ集積させる方法、および該エピトープを集積させた植物の提供を課題とする。

【解決手段】 ヒトT細胞エピトープをコメの胚乳中に集積させる手法として、T細胞エピトープ連結ペプチド(7crp)を直接種子中に集積させる方法、およびイネの主要な貯蔵タンパク質であるグルテリンの可変領域の中に挿入し、グルテリン貯蔵タンパク質の一部として発現・集積させる方法が開発された。本発明で開発されたT細胞エピトープ連結ペプチドを生産するイネは、スギ花粉症に対する食べるワクチンとして現実的に機能することが強く期待される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

貯蔵タンパク質プロモーターの制御下に以下の (a) ~ (c) のいずれかの DNA が配置された構造を有する DNA。

(a) アレルゲン特異的な T 細胞エピトープペプチドをコードする DNA の 5 ' 末端に貯蔵タンパク質シグナル配列をコードする DNA、および / または 3 ' 末端に小胞体係留シグナル配列をコードする DNA が付加された DNA

(b) アレルゲン特異的な T 細胞エピトープペプチドの N 末端に貯蔵タンパク質シグナル配列、および / または C 末端に小胞体係留シグナル配列が付加されたポリペプチドをコードする DNA

(c) 貯蔵タンパク質の可変領域へ、アレルゲン特異的な T 細胞エピトープペプチドが挿入された構造を有するポリペプチドをコードする DNA

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の DNA を含む、T 細胞エピトープ集積植物作製用ベクター。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の DNA、または請求項 2 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 4】

アレルゲン特異的な T 細胞エピトープを植物に集積させる方法であって、請求項 1 に記載の DNA、または請求項 2 に記載のベクターを植物へ導入することを特徴とする方法。

【請求項 5】

以下の工程 (a) ~ (c) を含む、T 細胞エピトープを植物に集積させる方法。

20

(a) アレルゲン特異的な T 細胞エピトープペプチドをコードする DNA を取得する工程、

(b) 前記 (a) で取得された DNA の 5 ' 末端に貯蔵タンパク質シグナル配列をコードする DNA、および / または 3 ' 末端に小胞体係留シグナル配列をコードする DNA を付加する工程、

(c) 前記 (b) の DNA を、植物において貯蔵タンパク質プロモーターの制御下で発現させる工程

【請求項 6】

以下の工程 (a) および (b) を含む、T 細胞エピトープを植物に集積させる方法。

30

(a) アレルゲン特異的な T 細胞エピトープペプチドをコードする DNA を取得する工程、

(b) 前記 (a) の DNA を、植物の貯蔵タンパク質の可変領域をコードする DNA 領域へ挿入し発現させる工程

【請求項 7】

アレルゲンがスギ花粉アレルゲンである、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

スギ花粉アレルゲンが C r y j 1 および C r y j 2 である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

T 細胞エピトープが植物の可食部位に集積されることを特徴とする、請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 10】

可食部位が種子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 4 ~ 10 のいずれかに記載の方法により作出される、T 細胞エピトープが集積したトランスジェニック植物。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の植物の子孫またはクローンである、トランスジェニック植物。

【請求項 13】

請求項 11 または 12 に記載の植物に由来する細胞。

50

【請求項 14】

請求項 11 または 12 に記載の植物の繁殖材料。

【請求項 15】

請求項 11 または 12 に記載の植物の種子。

【請求項 16】

熱に安定であることを特徴とする、請求項 15 に記載の種子。

【請求項 17】

請求項 10 に記載の方法により作出される、T細胞エピトープが集積したコメ。

【請求項 18】

請求項 15 もしくは 16 に記載の種子、または請求項 17 に記載のコメを有効成分とする、アレルギー性疾患の治療または予防のための食品組成物。 10

【請求項 19】

アレルギー性疾患が I 型アレルギーである、請求項 18 に記載の食品組成物。

【請求項 20】

請求項 4 ~ 10 のいずれかに記載の方法を用いた、T細胞エピトープが集積したトランスジェニック植物の製造方法。

【請求項 21】

請求項 10 に記載の方法を用いた、T細胞エピトープが集積したコメの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

【従来の技術】

近年、アレルギー疾患に対する根治的治療法は、従来注射によりアレルギーそのものを投与し、長期間にわたり段階的に増加させアレルギー特異的な免疫反応性を鈍らせる減感作療法であった。しかしこの療法では、アレルギー症状を引き起こす肥満細胞に結合している IgE 抗体との反応性が残っており、アナフィラキシーショック等の副作用が見られる問題があることが指摘されている。

【0002】

近年、アレルギーに由来する T細胞エピトープペプチドを投与するペプチド免疫療法が注目されている。その作用機構として、アレルギー特異的なヘルパー II 型の T細胞の不応答や欠失が起こると考えられる。T細胞エピトープを利用するペプチド免疫療法は一般にアレルギー反応を起こす B細胞エピトープを含まず、アレルギー特異的な IgE 抗体との結合性もないことから、従来の減感作療法で起きている副作用が起きにくく安全である。 30

【0003】

スギ花粉症のアレルギーに由来する T細胞エピトープペプチドについても、特異的 T細胞に対する高い反応性を示すことから、経口投与により T細胞の不応答化を誘導する能力を持つことが示唆されている（例えば、非特許文献 1 ~ 4 参照）。このことから、T細胞エピトープペプチドをペプチドワクチンとしてスギ花粉症の治療への応用が期待されていたものの、実際の応用形態については、未開発の状態であった。

【0004】

アレルギー特異的な T細胞エピトープを実際に有用な植物へ集積させる方法、および集積された有用な植物等については、これまでのところ知られていなかった。 40

【0005】

【非特許文献 1】

ヒラハラ・カズキ (Kazuki Hirahara) ら著, J. Allergy Clin. Immunol., Vol. 102, p. 961 - 967, 1998 年

【0006】

【非特許文献 2】

ヒラハラ・カズキ (Kazuki Hirahara) ら著, J. Allergy Clin. Immunol., Vol. 108, p. 94 - 100, 2001 50

年

【0007】

【非特許文献3】

ソネ・トシオ (Toshio Sone) 著, *J. Immunology*, p. 448 - 457, 1998年

【0008】

【非特許文献4】

ヨシトミ・トモミ (Tomomi Yoshitomi) 著, *Immunology*, Vol. 107, p. 517 - 522, 2002年

【0009】

10

【発明が解決しようとする課題】

本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、T細胞エピトープペプチドをペプチドワクチンとしてスギ花粉症の治療もしくは予防のために応用するために、該エピトープを集積させた植物を開発することにある。より詳しくは、本発明は、アレルゲン特異的T細胞エピトープを植物へ集積させる方法、および該エピトープを集積させた植物の提供を目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。本発明者らは、スギ花粉アレルゲンCryj1およびCryj2に見られる抗原提示細胞(マクロファージ)により提示される、ヒトの7個の主要な12~19アミノ酸残基からなるT細胞エピトープを連結させたハイブリッドペプチド(7crp)をコードする人工遺伝子を作成し、この遺伝子をコメの可食部である胚乳に特異的に発現させることにより、T細胞エピトープペプチドが集積したコメの開発に成功した。

20

【0011】

本発明のコメを食べること(経口投与)で免疫寛容の機構によりヘルパーII型のスギアレルゲン特異的なT細胞を不応答化または死滅化させて、根治的にスギ花粉症を治療することが可能であるものと考えられる。

【0012】

本発明におけるヒトT細胞エピトープをコメの胚乳中に集積させる手法として、7crpペプチドを直接種子中に集積させる方法、およびイネの主要な貯蔵タンパク質であるグルテリンの可変領域の中に挿入し、グルテリン貯蔵タンパク質の一部として発現・集積させる方法が開発された。本発明によるこれらの手法により、イネ種子中でT細胞エピトープ7連結ペプチド(7crp)を高度に集積させることに成功した。該種子では、1粒あたり最大60 μ gのT細胞エピトープ連結ペプチドが集積した。この集積量は、種子に含まれる全タンパク質の約4%に相当する。

30

【0013】

こうした可食部に集積させたアレルゲンのエピトープペプチドは、高度に集積されている場合、経口で摂取することで、こうしたアレルゲンに由来するアレルギー反応を免疫寛容機構で治療することが可能になる。

40

【0014】

これまでにマウスを対象としてマウスT細胞エピトープ連結ペプチドを経口投与した研究が報告され、40~200 μ gまたは2.5~250 μ gの投与により免疫寛容が誘導されることが示されている(Hirahara et al. Oral administration of a dominant T-cell determinant peptide inhibit allergen-specific TH1 and TH2 cell responses in Cryj2-primed mice *J Allergy Clin Immunol* 1998 102, 961-967, Yoshitomi et al. *Immunology* 2002, 107, 517-522)。この結果をヒトに適応すると、マウス重量を20g、ヒトの重量

50

を60kgと仮定したとき、ヒトにおいて免疫寛容を誘導するために必要なT細胞エピトープ連結ペプチドの量は7.5mg(2.5μg)~250mgと推定される。この推定必要量の場合は、T細胞エピトープ連結ペプチドを生産する種子(1粒あたり30μg集積する種子の場合、1種子の重量は約20mg)3.75mg~375mgが必要となり、その種子量で換算すると2.5g~250gで充分であることから、日常の食事量(100g~150g)で充分免疫寛容できる量といえる。従って、本発明で開発したT細胞エピトープ連結ペプチドを生産するイネは、スギ花粉症に対する食べるワクチンとして現実的に機能することが強く期待される。

【0015】

さらに、本発明の方法で集積させた7crpペプチドは、胚乳中での集積部位が異なることから、粘膜免疫系を介した誘導機構も若干異なると期待される。 10

【0016】

また、本発明の形質転換体種子に対する20分間の加熱処理の前後で、種子中のT細胞エピトープ連結ペプチドに変化が認められないことから、お米を炊飯してもT細胞エピトープ連結ペプチドが安定に存在することが分かった。また、お米の主要なアレルゲンタンパク質についても大きな変化は認められないことや、アレルギーを引き起こす可能性のある糖鎖はT細胞エピトープ連結ペプチドには結合していないことなど、現在までの研究において、花粉症に対する食べるワクチンとしての機能や安全性に関して、危険性を危惧されるような知見は得られていない。

【0017】

さらに、従来の大腸菌等の培養によるペプチドタンパク質の生産に比較して、安価に生産できる。すなわち1種子からイネの場合、1000~2000個の種子を作出できる。また種子で生産できることから、精製することなく、そのまま経口摂取できる。種子で生産されたペプチドは極めて安定であり、室温で種子を放置しても1年以上分解、活性が失われることがない。またタンク培養と比較して、生産量をコントロールすることが容易である。播種するタネの数で生産量をコントロールできる。 20

【0018】

上記の如く本発明者らは、アレルゲン特異的T細胞エピトープを植物へ集積させる方法、および該エピトープを集積させた植物の開発に成功し、本発明を完成させた。より詳しくは、本発明は、 30

〔1〕 貯蔵タンパク質プロモーターの制御下に以下の(a)~(c)のいずれかのDNAが配置された構造を有するDNA、

(a) アレルゲン特異的なT細胞エピトープペプチドをコードするDNAの5'末端に貯蔵タンパク質シグナル配列をコードするDNA、および/または3'末端に小胞体係留シグナル配列をコードするDNAが付加されたDNA

(b) アレルゲン特異的なT細胞エピトープペプチドのN末端に貯蔵タンパク質シグナル配列、および/またはC末端に小胞体係留シグナル配列が付加されたポリペプチドをコードするDNA

(c) 貯蔵タンパク質の可変領域へ、アレルゲン特異的なT細胞エピトープペプチドが挿入された構造を有するポリペプチドをコードするDNA 40

〔2〕 T細胞エピトープペプチドが、ヒトT細胞エピトープを少なくとも2個以上、好ましくは7回連結させたものである、〔1〕に記載のDNA、

〔3〕 ヒトT細胞エピトープを7個連結させたものである、〔2〕に記載のDNA、

〔4〕 貯蔵タンパク質プロモーターが、グルテリンGlub-1プロモーターである、〔1〕~〔3〕のいずれかに記載のDNA、

〔5〕 小胞体係留シグナル配列が、KDEL配列、SEKDEL配列、またはHDEL配列である、〔1〕~〔4〕のいずれかに記載のDNA、

〔6〕 〔1〕~〔5〕のいずれかに記載のDNAを含む、T細胞エピトープ集積植物作製用ベクター、

〔7〕 〔1〕~〔5〕のいずれかに記載のDNA、または〔6〕に記載のベクターを保 50

持する宿主細胞、

〔 8 〕 アレルゲン特異的な T 細胞エピトープを植物に集積させる方法であって、〔 1 〕 ~ 〔 5 〕 のいずれかに記載の DNA、または〔 6 〕に記載のベクターを植物へ導入することを特徴とする方法、

〔 9 〕 以下の工程 (a) ~ (c) を含む、T 細胞エピトープを植物に集積させる方法、
(a) アレルゲン特異的な T 細胞エピトープペプチドをコードする DNA を取得する工程

、
(b) 前記 (a) で取得された DNA の 5 ' 末端に貯蔵タンパク質シグナル配列をコードする DNA、および / または 3 ' 末端に小胞体係留シグナル配列をコードする DNA を付加する工程、

(c) 前記 (b) の DNA を、植物において貯蔵タンパク質プロモーターの制御下で発現させる工程

〔 10 〕 以下の工程 (a) および (b) を含む、T 細胞エピトープを植物に集積させる方法、

(a) アレルゲン特異的な T 細胞エピトープペプチドをコードする DNA を取得する工程、

(b) 前記 (a) の DNA を、植物の貯蔵タンパク質の可変領域をコードする DNA 領域へ挿入し発現させる工程

〔 11 〕 貯蔵タンパク質がグルテリンである、〔 8 〕 ~ 〔 10 〕 のいずれかに記載の方法、

〔 12 〕 エピトープペプチドが、ヒト T 細胞エピトープを少なくとも 2 個以上、好ましくは 7 回連結させたものである、〔 8 〕 ~ 〔 11 〕 のいずれかに記載の方法、

〔 13 〕 アレルゲンがスギ花粉アレルゲンである、〔 8 〕 ~ 〔 12 〕 のいずれかに記載の方法、

〔 14 〕 スギ花粉アレルゲンが C r y j 1 および C r y j 2 である、〔 13 〕 に記載の方法、

〔 15 〕 T 細胞エピトープが植物の可食部位に集積されることを特徴とする、〔 8 〕 ~ 〔 14 〕 のいずれかに記載の方法、

〔 16 〕 可食部位が種子である、〔 15 〕 に記載の方法、

〔 17 〕 植物が被子植物である、〔 8 〕 ~ 〔 16 〕 のいずれかに記載の方法、

〔 18 〕 被子植物がイネ科植物である、〔 17 〕 に記載の方法、

〔 19 〕 イネ科植物がイネである、〔 18 〕 に記載の方法、

〔 20 〕 〔 8 〕 ~ 〔 19 〕 のいずれかに記載の方法により作出される、T 細胞エピトープが集積したトランスジェニック植物、

〔 21 〕 〔 20 〕 に記載の植物の子孫またはクローンである、トランスジェニック植物、

〔 22 〕 〔 20 〕 または 〔 21 〕 に記載の植物に由来する細胞、

〔 23 〕 〔 20 〕 または 〔 21 〕 に記載の植物の繁殖材料、

〔 24 〕 〔 20 〕 または 〔 21 〕 に記載の植物の種子、

〔 25 〕 熱に安定であることを特徴とする、〔 24 〕 に記載の種子、

〔 26 〕 〔 19 〕 に記載の方法により作出される、T 細胞エピトープが集積したコメ、

〔 27 〕 〔 24 〕 もしくは 〔 25 〕 に記載の種子、または 〔 26 〕 に記載のコメを有効成分とする、アレルギー性疾患の治療または予防のための食品組成物、

〔 28 〕 アレルギー性疾患が I 型アレルギーである、〔 27 〕 に記載の食品組成物、

〔 29 〕 I 型アレルギーが花粉症またはダニアレルギーである、〔 28 〕 に記載の食品組成物、

〔 30 〕 花粉がスギ、ヒノキ、ハンノキ、ブタクサ、またはカモガヤである、〔 29 〕 に記載の食品組成物、

〔 31 〕 アレルギーが食物アレルギーである、〔 27 〕 に記載の食品組成物、

〔 32 〕 食物がソバである、〔 31 〕 に記載の食品組成物、

10

20

30

40

50

〔33〕〔8〕～〔19〕のいずれかに記載の方法を用いた、T細胞エピトープが集積したトランスジェニック植物の製造方法、

〔34〕〔19〕に記載の方法を用いた、T細胞エピトープが集積したコメの製造方法、を提供するものである。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明は、アレルゲン特異的なT細胞エピトープを植物へ集積させる方法を提供する。

本発明は、アレルゲンを抗原として抗原提示細胞（マクロファージ）によって提示されるT細胞抗原決定基（エピトープ）を、植物中において発現させることを特徴とする方法である。本発明において「アレルゲン特異的なT細胞エピトープ」とは、アレルゲンを抗原として抗原提示細胞によって提示されるT細胞エピトープを言う。

10

【0020】

アレルゲンとは一般的に、アレルギー疾患（アレルギー反応）の原因となる抗原物質を言う。本発明におけるアレルゲンには、特に限定されるものではないが、タンパク質、糖タンパク質等の自然界にある物質のみならず、合成されたタンパク質も含まれる。自然界におけるアレルゲンとしては、例えば、花粉（スギ、ヒノキ、ハンノキ、ブタクサ、イネ科のカモガヤ花粉等）アレルゲン、動物（イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウマ、ウシ等）由来アレルゲン、昆虫アレルゲン、寄生虫アレルゲン、食物アレルゲン、カビアレルゲン等を挙げることができる。

【0021】

本発明において好適に使用されるアレルゲンとしては、花粉アレルゲン、ダニアレルゲン、食物アレルゲン等を挙げることができ、さらに好ましくは、スギ花粉由来の花粉尘アレルゲンである。より具体的には、上記スギ花粉アレルゲンとして、Cry j 1 (H. Yasueda, Y. Yui, T. Shimizu, T. Shida. Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (Cryptomeria japonica) pollen. J. Allergy Clin. Immunol. 1983; vol. 71, p. 77-86.; T Sone, N. Komiyama, K Shimizu, T Kusakabe, K. Morikubo and K Kino Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen Biochem. Biophys. Res. Comm. 199, 619-625 (1994)) または Cry j 2 (M. Sakaguchi, S. Inoue, M. Taniyai, S. Ando, M. Usui, T. Matuhashi. Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen. Allergy 1990; vol. 45, p. 309-312.; N Komiyama, T Sone, K Shimizu, K Morikubo and K Kino, cDNA cloning and expression of Cry j II, the second major allergen of Japanese cedar pollen. Biochem. Biophys. Res. Comm 201, 1021-1028 (1994))等を例示することができる。また、上記「食物」として、例えば、ソバ、コムギ、卵、牛乳、落花生等を挙げることができる。

20

30

40

【0022】

上記方法に使用されるT細胞抗原決定基（本明細書においては、「エピトープ」もしくは「エピトープペプチド」と記載する場合あり）は、通常、上記のアレルゲンが抗原提示細胞によって分解され（抗原処理され）、細胞表面に提示される抗原ペプチド、もしくは該ペプチドの部分領域である。即ち、本発明のエピトープは、T細胞レセプターによってア

50

レルゲン由来抗原ペプチドとして認識し得るようなペプチドであれば、そのアミノ酸配列は、特に制限されない。

【0023】

本発明のT細胞エピトープは、特に制限されるものではないが、好ましくは、ヒトT細胞エピトープである。

【0024】

本発明のエピトープ(エピトープペプチド)は、アレルゲンの種類等によりそのペプチド長は異なるため、特定することは困難であるが、通常、約10~25アミノ酸残基からなり、より好ましくは12~19アミノ酸残基からなる。

【0025】

また、本発明のエピトープは、好ましくはヒトT細胞エピトープを2個以上連結させたものがよい。2個以上連結させることにより、免疫寛容機構の誘導効果が上昇することが期待される。より具体的には、本発明のエピトープとして、後述の実施例で示すようにエピトープを7個連結させたペプチド(例えば、7c r p(配列番号:1)等)を好適に使用することができる。また、複数個連結させた、例えば7c r p等のエピトープペプチドを、さらに2回(配列番号:2)、3回と複数回タンデムに繋いだペプチドもまた、本発明に利用可能である。

10

【0026】

エピトープを利用したペプチド免疫の場合、個々人の遺伝子型により認識されるエピトープが異なるため、多くのひとに効果を持たせるために、本発明においては複数のエピトープが好適に使用される。

20

【0027】

本発明の方法の好ましい態様においては、本発明のエピトープを植物体内において貯蔵タンパク質プロモーターの支配下(制御下)で発現させる方法である。より具体的には、まずアレルゲン特異的なヒトT細胞エピトープペプチドをコードするDNAを取得し(工程(a))、次いで、工程(a)で取得されたDNAの5'末端に貯蔵タンパク質シグナル配列をコードするDNA、および/または3'末端に小胞体係留シグナル配列をコードするDNAを付加する(工程(b))。次いで、前記(b)のDNAを、植物において貯蔵タンパク質プロモーターの制御下で発現させる(工程(c))。

【0028】

本発明における貯蔵タンパク質とは、通常、植物体で主にエネルギー源として種子中に貯えられるタンパク質を指す。貯蔵タンパク質としては、例えば、単純タンパク質であるグルテリン(glutel in)やプロラミン(prolam in)を挙げることができる。本発明の貯蔵タンパク質としては、好ましくはグルテリンを示すことができる。グルテリンをコードする遺伝子のGenBankのアクセッション番号は、X54314(O.sativa GluB-1 gene for glutelin)であり、該遺伝子のcDNAのアクセッション番号は、X05664である。

30

【0029】

本発明におけるプロモーターは、発現させたい遺伝子の種類や導入する細胞の種類に応じて、当業者においては公知のプロモーターを適宜選択、もしくは改変して使用することができる。本発明の好ましい態様においては、貯蔵タンパク質プロモーターが利用することができる。本発明において用いられる貯蔵タンパク質プロモーターの一例を示せば、グルテリンGluB-1プロモーターを挙げることができる。該プロモーターの長さは、通常1.3kb以上であり、好ましくは2.3kb以上であるが、本発明のプロモーターと同等の機能を有する限り、この長さに特に制限されるものではない。好ましくは、2.3k GluB-1プロモーターを挙げることができる。通常、プロモーターを長くすることにより、下流に存在する遺伝子によってコードされるタンパク質の発現・集積効率が高くなる。グルテリンGluB-1プロモーターは強力なプロモーター活性を有するため、イネまたはイネ以外の穀類についても好適に使用することができる。

40

【0030】

50

上記工程 (a) におけるアレルゲン特異的なヒト T 細胞エピトープペプチドをコードする DNA は、ゲノム DNA、c DNA、および化学合成 DNA が含まれる。アレルゲンの由来となる生物 (例えば、イネ等) からのゲノム DNA および c DNA の調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノム DNA は、例えば、アレルゲンの由来となる生物からゲノム DNA を抽出し、ゲノミックライブラリー (ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PAC など) が利用できる) を作成し、これを展開して、アレルゲン特異的なヒト T 細胞エピトープペプチドをコードする DNA の塩基配列情報を基に作製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、本発明のアレルゲン特異的なヒト T 細胞エピトープペプチドをコードする DNA に特異的なプライマーを作成し、これを利用した PCR を行うことにより調製することも可能である。また、c DNA は、例えば、アレルゲンの由来となる生物から抽出した mRNA を基に c DNA を合成し、これを ZAP 等のベクターに挿入して c DNA ライブラリーを作成し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCR を行うことにより調製することが可能である。

10

【 0 0 3 1 】

本発明のエピトープペプチドをコードする DNA は、好ましくは、該ペプチドのアミノ酸配列情報を基に、適宜、人工的に合成することも可能である。その際、貯蔵タンパク質遺伝子でよく使用されるコドンを参考に、アミノ酸の縮重等を考慮して目的の DNA を合成することができる。また、本発明のエピトープペプチド、例えば、7 c r p を用いる場合、イネ種子で効率良く翻訳されるように、該ペプチドをコードする DNA 配列は、イネ種子貯蔵タンパク質遺伝子において高頻度に使用されるコドンを使用して作製することができる。

20

【 0 0 3 2 】

本発明において好適に使用されるコドンとしては、特に限定されるものではないが、例えば、表 1 のコドンを示すことができる。

【 0 0 3 3 】**【 表 1 】**

Ala(A)	Asp(D)	Arg(R)	Asn(N)	Cys (C)
GCA GCT	GAT	CGT AGG AGA	AAT AAC	TGC TGT
Gly(G)	Glu(E)	Gln(Q)	Leu(L)	停止コドン
GGC GGA	GAA GAG	CAA CAG	CTC CTT CTA TTG	TAA TGA TAG
His(H)	Ile(I)	Phe(F)	Pro(P)	Thr(T)
CAT CAC	ATC ATT	TTC	CCA CCC CCT	ACT ACA ACC
Lys(K)	Ser(S)	Trp(W)	Tyr(Y)	Val(V)
AAG	AGT TCT AGC	TGG	TAC TAT	GTT GTA
Met(M)				
ATG				

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

DNAの合成は、当業者においては、市販のDNA合成機等を利用して、適宜実施することができる。

【 0 0 3 5 】

上記工程 (b) における貯蔵タンパク質シグナル (ペプチド) 配列としては、公知の種々の貯蔵タンパク質シグナル配列を、適宜、使用することが可能である。本発明の貯蔵タンパク質シグナル配列のアミノ酸配列に関する情報は、当業者においては公知の文献等により容易に入手することが可能である。貯蔵タンパク質シグナルは、本発明のエピトープペプチドを、小胞体へ移行させる働きを有し、該ペプチドが細胞質へ移行し分解を受けたり、あるいは細胞外へ分泌されることを防ぐ役割を担う。

【 0 0 3 6 】

本発明の貯蔵タンパク質シグナル配列としては、好ましくは、グルテリン (G l u B - 1) タンパク質のシグナル配列を用いることができる。具体的には、本発明に使用可能な貯蔵タンパク質シグナル配列として、以下の配列を示すことができる。 M A S S V F S R F S I Y F C V L L L C H G S M A (配列番号 : 3)

また、他のグルテリン (G l u A - 2) のシグナル配列である、 M A S I N R P I V F F

T V C L F L L C D G S L A (配列番号 : 4)、あるいは、26 k D のグロブリンのシグナル配列である、M A S K V V F F A A A L M A A M V A I S G A Q (配列番号 : 5) を用いることも可能である。

【0037】

また、本発明の小胞体係留シグナル (E R - r e t e n t i o n s i g n a l) 配列としては、例えば、K D E L 配列、S E K D E L 配列、または H D E L 配列等を利用することができるが、これらに特に制限されるものではない。また、本発明の小胞体係留シグナル配列をコードする D N A は、例えば、K D E L 配列をコードする D N A の下流の 3 ' 非翻訳領域を含んでいてもよい。この 3 ' 非翻訳領域は、特に制限されるものではないが、通常 100 ~ 1000 b p 程度の長さである。一例を示せば、本発明の小胞体係留シグナル配列をコードする D N A として、K D E L 配列をコードする D N A と該 D N A の下流の約 650 b p 程度のグルテリン 3 ' 非翻訳領域を含む領域を合わせた D N A を示すことができる。一般的に、上記 3 ' 非翻訳領域として、グルテリン等の貯蔵タンパク質遺伝子の 3 ' 非翻訳領域を好適に使用することができる。また、N O S ターミネータ、または 35 S C a M V ターミネータを使用することも可能である。上記の配列は、種子等の貯蔵部位において、外来タンパク質の集積量を向上させる機能を有する。

10

【0038】

上記貯蔵タンパク質シグナル配列または小胞体係留シグナル配列をコードする D N A は、当業者においては、アミノ酸配列の縮重等を考慮して、適宜、市販の D N A 合成機等を利用して取得 (合成) することができる。

20

【0039】

また、工程 (a) で取得される D N A の 5 ' 末端への貯蔵タンパク質シグナル配列をコードする D N A の付加、および 3 ' 末端に小胞体係留シグナル配列をコードする D N A の付加は、当業者においては、公知の遺伝子工学技術を利用して行うことができる。上記の「5 ' 末端」または「3 ' 末端」とは、通常、プロモーターから転写を受ける方向が、5 ' 末端 3 ' 末端であるような向きを示す末端として定義される。従って、プロモーター側 (方向) の D N A の末端部は、「5 ' 末端」として定義される。

【0040】

上記工程 (c) において、D N A を植物体内において貯蔵タンパク質プロモーターの制御下で発現させるためには、通常、該 D N A の発現が可能なように貯蔵タンパク質プロモーターと該 D N A とを結合させた D N A を植物体へ導入することによって実施することができる。プロモーターの制御を受けるように該プロモーターの下流に発現させたい所望の D N A を配置させることは、当業者においては一般的な遺伝子工学技術を用いて容易に行い得ることである。

30

【0041】

また、本発明の方法によってエピトープの集積が可能な植物としては、特定の種に限定されるものではないが、通常、被子植物であり、好ましくは単子葉植物であり、より好ましくはイネ科植物である。本発明の植物は、双子葉植物であってもよく、例えば、双子葉植物の種子プロモーター (例えば、子葉や胚特異的) を利用することにより、マメ等の植物へもエピトープを集積させることが可能である。また、イネ科植物の例としては、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ等の穀類を挙げることができるが、本発明の植物として最も好ましくは、イネである。本発明の方法においては、使用するプロモーターを植物の種類を考慮して、適宜選択することにより、多くの種類の植物においてエピトープを集積させることが可能である。

40

【0042】

本発明の方法においてエピトープが集積される植物体における部位が、可食部位である場合には、例えば、該部位をヒトが食することにより、本発明のエピトープを容易に体内に取り入れることが可能である。例えば、本発明の植物がイネである場合には、エピトープを胚乳中に集積させることが可能である。

【0043】

50

本発明の方法は、T細胞エピトープが、好ましくは植物体の可食部位に集積されることを特徴とする有用な方法である。可食部位は、植物の種類によって異なるため、必ずしも限定されるものではないが、例えば、種子、葉、根等を挙げることができる。

【0044】

集積部位として、より具体的には、イネ、コムギ、トウモロコシ等の場合胚乳、ダイズなどのマメの場合子葉や胚、ジャガイモ等の塊茎、にんじんの根、トマト、バナナ等の果実を挙げることができる。

【0045】

本発明の上記方法において使用される本発明のエピトープを植物体内において発現し得るDNAもまた、本発明に含まれる。このようなDNAとしては、例えば、貯蔵タンパク質プロモーターの制御下に以下のいずれかに記載のDNAが配置された構造を有するDNAを示すことができる。

10

(a) アレルゲン特異的なT細胞エピトープペプチドをコードするDNAの5'末端に貯蔵タンパク質シグナル配列をコードするDNA、および/または3'末端に小胞体係留シグナル配列をコードするDNAが付加されたDNA

(b) アレルゲン特異的なT細胞エピトープペプチドのN末端に貯蔵タンパク質シグナル配列、および/またはC末端に小胞体係留シグナル配列が付加されたポリペプチドをコードするDNA

【0046】

上記の「貯蔵タンパク質プロモーターの制御下にDNAが配置された」とは、該DNAの発現が可能ないように貯蔵タンパク質プロモーターと該DNAとが結合していることを言う。即ち、プロモーターの転写の活性化に伴い、下流のDNAの発現が誘導されるようにプロモーターと下流のDNAが結合していることを指す。

20

【0047】

また本発明の別の態様においては、T細胞エピトープを貯蔵タンパク質の中へ挿入し、該エピトープを貯蔵タンパク質の一部として発現・集積させる方法を提供する。

【0048】

上記方法の好ましい態様においては、まず、アレルゲン特異的なT細胞エピトープペプチドをコードするDNAを取得し、次いで、該DNAを、植物の貯蔵タンパク質の可変領域をコードするDNA領域へ挿入し発現させる。

30

【0049】

上記方法においてエピトープが挿入される貯蔵タンパク質における部位は、貯蔵タンパク質の可変領域であることが好ましい。「可変領域」とは、進化過程でアミノ酸配列の種類や長さなどで極めて変異に富んだ領域を言う。従って、外来ペプチドを挿入しても立体構造に影響を及ぼさないことから、外来ペプチドを貯蔵タンパク質の一部として集積することが可能であり、また貯蔵タンパク質の一部として挙動するため、導入した貯蔵タンパク質と同じ貯蔵部位に集積させることが可能である。

【0050】

本発明の可変領域としては、例えばイネのグルテリンの場合、酸性サブユニットの3ヶ所（グルテリンG1uB-1遺伝子の場合N末端からアミノ酸140、210、270~310の領域）、および塩基性サブユニットのC末端領域を挙げることができる。また、上記のそれぞれの可変領域に本発明のエピトープを1個ずつ挿入することも可能である。また、グルテリンは11Sグロブリンファミリー（ダイズのグリシニンやエンバクのグロブリンが仲間）に属し、このファミリーに属するグルテリン以外のタンパク質であっても、上記で例示した可変領域へ、外来ペプチドを挿入することができる。ただし、イネグロブリン（エンバクグロブリンとは異なる仲間）の場合には、N末端から110くらいの可変領域にエピトープを挿入することが可能である。

40

【0051】

上記方法の一例を示せば、ヒトT細胞エピトープをグルテリン貯蔵タンパク質の一部とし

50

て集積させるには、グルテリン GluA - 2 遺伝子、p R E E 9 9 c D N A クロンのグルテリン前駆体コード領域のアミノ酸残基 No 2 7 5 から 3 0 5 の間（酸性サブユニットコード領域）に 7 c r p コード領域 9 6 アミノ酸配列を 1 個（1 × 7 c r p）、または 2 個（2 × 7 c r p）直列に挿入して、グルテリンの一部として発現させる方法が挙げられる。

【0052】

上記方法において、本発明のエピトープをコードする DNA を、貯蔵タンパク質の可変領域をコードする DNA 領域へ挿入することは、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術を用いて容易に行い得ることである。

【0053】

上記方法において使用される T 細胞エピトープが貯蔵タンパク質の中へ挿入された構造を有するポリペプチドをコードする DNA もまた、本発明に含まれる。このような DNA としては、例えば、貯蔵タンパク質プロモーターの制御下に、（c）貯蔵タンパク質のアミノ酸配列中（好ましくは、可変領域）へ、アレルゲン特異的な T 細胞エピトープペプチドが挿入された構造を有するポリペプチドをコードする DNA、を挙げることができる。通常、貯蔵タンパク質の上流に本来備わっているプロモーターを、上記のプロモーターとして利用することができる。

【0054】

また本発明は、本発明の DNA を含むベクター、および本発明の DNA もしくは本発明のベクターを保持する宿主細胞を提供する。本発明のベクターとしては、本発明の DNA を安定に保持するものであれば特に制限されない。本発明のベクターは、当業者においては、発現させたい植物の種類を適宜考慮して、公知の種々のベクターへ上記 DNA をクロニングすることにより、作製することができる。公知ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる（*Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4 - 11.11*）。

【0055】

本発明のベクターの一例として、後述の実施例に記載のベクター p G l u B s i g 7 C r p K D E L を挙げることができる。本発明のベクターは、本発明のエピトープ集積方法に使用可能であり、T 細胞エピトープ集積植物作製用ベクターとして有用である。

【0056】

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の公知の細胞が用いられる。ここでいう「宿主細胞」には、種々の形態の植物細胞が含まれ、その形態としては、植物体に再生可能なあらゆる種類の形態の植物細胞が含まれる。例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、苗条原基、多芽体、毛状根、カルスなどが含まれるが、これらに制限されない。また、本ベクターの保存、複製等が目的の場合には、本発明の宿主細胞は、必ずしも植物由来の細胞である必要はなく、例えば、大腸菌、酵母または動物細胞等であってもよい。

【0057】

宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（*Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1 - 9.9*）、リポフェクタミン法（G I B C O - B R L 社製）、マイクロインジェクション法等の公知の方法で行うことができる。

【0058】

また本発明は、本発明の上記 DNA もしくはベクターを植物へ導入することを特徴とする T 細胞エピトープを植物に集積させる方法、並びに、本発明の DNA もしくはベクターを植物へ導入することを特徴とする T 細胞エピトープを集積した植物の製造方法に関する。

10

20

30

40

50

本発明の好ましい態様においては、本発明の方法を用いた、T細胞エピトープが集積したトランスジェニック植物の製造方法、および、本発明の方法を用いた、T細胞エピトープが集積したコメの製造方法を提供する。

【0059】

本発明のDNAを利用して、アレルゲン特異的なヒトT細胞エピトープが集積した形質転換植物体を作製する場合には、例えば、本発明のDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を生育(再生)させる。植物体の生育(再生)は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である(Tokira (1995) Plant Physiol. 100:1503-1507参照)。例えば、イネにおいては、形質転換植物体を作成する手法については、
10 ポリエチレングリコールによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体を生育(再生)させる方法(Datta, S.K. (1995) In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds.) pp66-74)、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体を生育(再生)させる方法(Tokiet al (1992) Plant Physiol. 100, 1503-1507)、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を生育(再生)させる方法(Christou et al. (1991) Bio/technology, 9: 957-962.)およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し、植物体を生育(再生)させる方法(Hiei et al. (1994) Plant J. 6: 271-282.)など、いくつかの
20 技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を適宜利用することができる。上記アグロバクテリウム法を用いる場合、例えばNagelらの方法(Microbiol. Lett., 1990, 67, 325.)が用いられる。この方法によれば、ベクターをアグロバクテリウム細菌中に形質転換して、次いで形質転換されたアグロバクテリウムを、リーフディスク法等の公知の方法により植物細胞へ導入する。

【0060】

また、本発明のDNAまたはベクターを導入する植物は、外植片であってもよく、これらの植物から培養細胞を調製し、得られた培養細胞に導入してもよい。本発明の「植物細胞」は、例えば葉、根、茎、花および種子中の胚盤等の植物細胞、カルス、懸濁培養細胞等
30 が挙げられる。

【0061】

また、本発明のDNAまたは核酸の導入により形質転換された植物細胞を効率的に選択するために、本発明のDNAまたはベクターは、適当な選抜マーカー遺伝子を含む、もしくは選抜マーカー遺伝子を含むプラスミドベクターと共に植物細胞へ導入するのが好ましい。この目的に使用される選抜マーカー遺伝子は、例えば抗生物質ハイグロマイシンに耐性であるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、カナマイシンまたはゲンタマイシンに耐性であるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、および除草剤ホスフィンオスリシンに耐性であるアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。

【0062】

組み換えベクターを導入した植物細胞は、導入された選抜マーカー遺伝子の種類に従って適当な選抜用薬剤を含む公知の選抜用培地に置床し培養する。これにより形質転換された植物培養細胞を得ることができる。

【0063】

形質転換細胞から再生させた植物体は、次いで順化用培地で培養する。その後、順化した再生植物体を、通常の栽培条件で栽培すると、植物体を得られ、成熟して結実して種子を得ることも可能である。

【0064】

なお、このように生育(再生)された形質転換植物体へ導入された本発明のDNAの存在は、公知のPCR法やサザンハイブリダイゼーション法によって確認することができる。
40

10

20

30

40

50

この場合、形質転換植物体からのDNAの抽出は、公知のJ. Sambrookらの方法(Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に準じて実施することができる。

【0065】

さらに本発明は、本発明の方法によって作出される、T細胞エピトープが集積したトランスジェニック植物(形質転換植物)、該植物に由来する細胞を提供する。例えば、本発明の方法により、スギ花粉アレルゲンヒトT細胞エピトープを種子に集積させた植物は、スギ花粉症緩和作物として有用である。

【0066】

一旦、本発明のT細胞エピトープが集積した形質転換植物体を得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料(例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等)を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明の方法により作出されるT細胞エピトープが集積したトランスジェニック植物の子孫またはクローン、該トランスジェニック植物あるいは子孫やクローン由来の細胞、繁殖材料、並びに種子が含まれる。本発明の種子は熱に安定な性質を有するものと期待される。本発明の好ましい態様においては、例えば、アレルゲン特異的なヒトT細胞エピトープが集積したコメ(イネ)を挙げるができる。

【0067】

さらに本発明は、アレルギー性疾患の治療または予防のための食品組成物を提供する。本発明の食品組成物は、本発明の方法によって作出される植物のエピトープが集積した部位(例えば、種子、コメ)、またはこれらから抽出されるエピトープを含む抽出物から構成される。より具体的には、本発明の方法によって得られるエピトープが集積した種子もしくはコメ、またはこれらから抽出される成分を含む、アレルギー性疾患の治療または予防のための食品組成物である。本発明の「組成物」は、必ずしも、種子もしくはコメにさらに複数種の物質が添加されている必要はなく、本発明の種子またはコメのみから構成される食品であってもよい。

【0068】

本発明の食品組成物は加熱等の調理法に供することも可能である。また、食品衛生上許容される配合物を混合して、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養補助食品等に加工して利用することができる。例えば安定化剤、保存剤、着色料、香料、ビタミン等の配合物を上記食品組成物に適宜添加し、混合し、常法により、錠剤、粒状、顆粒状、粉末状、カプセル状、液状、クリーム状、飲料等の組成物に適した形態とすることができる。

【0069】

また本発明の方法によって作出される植物由来のエピトープが集積した部位(種子、コメ等)を有効成分とする、アレルギー性疾患の治療または予防のための医薬組成物も、本発明に含まれる。

【0070】

本発明において、アレルギー性疾患(allergic disease)とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。代表的なアレルギー性疾患として例えば、花粉症、気管支喘息、食物アレルギー、アレルギー性鼻炎、または昆虫アレルギー等を示すことができる。また、アレルギー性疾患は、通常、I~IV型アレルギー反応を示す疾患に区別することができる。本発明のアレルギー性疾患としては、特に限定されるものではないが、好ましくはI型アレルギーである。I型アレルギーとしては、例えば、花粉症、ダニアレルギー、気管支喘息、食物アレルギー、アレルギー性鼻炎等を挙げるができる。本発明のアレルギー性疾患として好ましくは、スギ花粉症またはダニアレルギーを挙げることができる。上記疾患に対応したアレルゲン特異的なエピトープを用いた本発明の方法によって、所謂テラーメイド医療と呼ばれる治療への応用が期待される。

【0071】

10

20

30

40

50

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕 T細胞エピトープ連結ペプチド発現プラスミドの作製とイネキタアケへの導入

スギ花粉アレルゲンT細胞エピトープ連結ペプチドをイネ種子中で発現させるための発現プラスミドを作製した。イネ種子主要タンパク質であるグルテリンG l u B - 1のプロモーター（従来は1.3kbを用いていたが、本発明では2.3kbを用いた；プロモーター活性は5倍以上高まる）、シグナル配列とT細胞エピトープ連結ペプチド遺伝子を連結した後、種子における外来遺伝子産物の集積量を向上させる機能を持つER係留シグナルK D E L配列をT細胞エピトープ連結ペプチドの3'末端に付加することにより、発現プラスミドp G l u B s i g 7 C r p K D E Lを構築した。2.3Kb G l u B - 1プロモーター配列、グルテリンシグナル配列、7 c r pエピトープ配列、K D E L配列、および0.6K G l u B - 1 3'配列を有する実施例において使用したDNAの塩基配列を配列番号：6に示し、該DNAによってコードされるアミノ酸配列を配列番号：7に示す。

10

【0072】

また、T細胞エピトープ連結ペプチド発現に対するシグナル配列やK D E L配列の作用を調べるため、p G l u B s i g 7 C r p K D E Lからシグナル配列を除いたプラスミドp G l u B 7 C r p K D E LやK D E L配列を除いたプラスミドp G l u B s i g 7 C r p

20

【0073】

またイネの主要な貯蔵タンパク質であるグルテリン（G l u A - 2）の酸性サブユニットの可変領域に7 c r pペプチド配列を挿入して、7 c r pペプチドをグルテリンの一部として発現させた。これらのプラスミドをアグロバクテリア法によりイネキタアケに導入して、ハイグロマイシン耐性を指標として形質転換体の選抜を行った。これらの解析にはそれぞれのコンストラクトについて30系統以上の形質転換体を用いた。

【0074】

〔実施例2〕 形質転換体種子におけるT細胞エピトープ連結ペプチドの検出

シグナル配列を持たないp G l u B 7 C r p K D E L形質転換体の登熟種子から全RNA画分を回収して、T細胞エピトープ連結ペプチド遺伝子をプローブとしたノーザン解析を行った。その結果、32系統のうち27系統で転写産物が検出されたことから、種子におけるT細胞エピトープ連結ペプチドの集積が期待された。

30

【0075】

そこで、完熟種子からタンパク質を抽出して電気泳動で分離した後、C B B染色あるいは特異抗体を用いたウェスタンブロット解析により可視化した。その結果、期待に反して、T細胞エピトープ連結ペプチドのシグナルは検出されなかった。その理由として、シグナル配列を持たないため、T細胞エピトープ連結ペプチドが粗面小胞体に移行せず細胞質へと移行して分解を受けているか、あるいは細胞外へ分泌されていることが考えられる。

【0076】

次に、シグナル配列を持つp G l u B s i g 7 C r p K D E L形質転換体の解析を行った。登熟種子から調製した全RNA画分に対するノーザン解析の結果、34系統のうち29系統で転写産物のシグナルが検出され、特に1番、5番、10番の系統で強いシグナルが認められた（図1）。そこで、系統番号10番の完熟種子から全タンパク質を調製して解析した結果、非形質転換体では認められない分子量約11,000の移動度を示すシグナルが検出された。この見かけの分子量はT細胞エピトープ連結ペプチドの遺伝子配列から推定される分子量11,229とよく一致することから、このシグナルがT細胞エピトープ連結ペプチドに由来するものであると判断した。

40

【0077】

次に、ウェスタンブロット解析におけるシグナル強度を指標として、種子中のT細胞エピ

50

トープ連結ペプチドの集積量を推定した。シグナル強度の基準タンパク質として、大腸菌で発現させ精製したT細胞エプトープ連結ペプチド-ヒスチジンタグ融合タンパク質を使用した。その結果、1番、10番、15番、17番、31番、34番などの系統で比較的多くのT細胞エプトープ連結ペプチドが蓄積した。このうち、最も高い集積量が認められた系統番号10番の種子では、全種子タンパク質の4%に相当する60 μ gのT細胞エプトープ連結ペプチドの集積が確認された。

【0078】

一方、KDEL配列を除いたpGluBsig7Crp形質転換体について解析した結果、38系統のうち25系統で転写産物が検出され、完熟種子タンパク質に対するウェスタン解析の結果、T細胞エプトープ連結ペプチドの蓄積が認められた。しかし、KDEL配列を持つpGluBsig7CrpKDEL形質転換体と比較すると、T細胞エプトープ連結ペプチドの蓄積量は大きく減少しており、最も高い蓄積量を示した系統の種子でも、全種子タンパク質の1.1%に相当する16 μ gであった(図2)。

10

【0079】

以上の結果から、pGluBsig7CrpKDELプラスミドの導入により、イネ種子でのT細胞エプトープ連結ペプチドの生産に成功したこと、そしてT細胞エプトープ連結ペプチドの発現にはシグナル配列が必須であること、KDEL配列の付加により集積量が向上することが分かった。

【0080】

〔実施例3〕 イネに導入したT細胞エプトープ連結ペプチド遺伝子の検出
形質転換体のゲノムに導入されたT細胞エプトープ連結ペプチド遺伝子を検出してそのコピー数を同定するため、サザンプロット法による形質転換体のゲノムDNAの解析を行った。得られた形質転換体のうちT細胞エプトープ連結ペプチドの発現量の高い系統の形質転換体の葉からゲノムDNAを調製して制限酵素Sac Iで処理した後、T細胞エプトープ連結ペプチド遺伝子の全領域をプローブとして用いたサザンプロット解析を行った。形質転換に用いたプラスミドはSac Iにより1箇所だけ切断されることから、サザン解析で検出されるバンドの数がイネゲノムに導入されたT細胞エプトープ連結ペプチド遺伝子のコピー数に相当する。サザンプロット解析の結果、pGluBsig7CrpKDEL形質転換体では、1番では2コピー、10番では4コピー、17番では2コピーのT細胞エプトープ連結ペプチド遺伝子が形質転換体のゲノムに導入されていることが確認された。また、pGluBsig7Crp形質転換体では、17番で2コピー、19番で1コピー、25番では2コピーの遺伝子の導入が確認された(図3)。

20

30

【0081】

〔実施例4〕 イネ種子におけるT細胞エプトープ連結ペプチドの発現特性
T細胞エプトープ連結ペプチドの発現量が最も高いpGluBsig7CrpKDELの系統番号10番の種子に対して、種子登熟期におけるT細胞エプトープ連結ペプチドの発現経過を解析するため、開花後種々の時点で種子からタンパク質を抽出し、ウェスタンプロットにより解析した。T細胞エプトープ連結ペプチドのシグナルは、開花後5日後に初めて検出され、その後徐々に増加し、完熟種子のレベルに至った。この結果は、GluB-1タンパク質を特異的に認識する抗体を用いて解析したGluB-1タンパク質の発現経過とよく一致している(図4)。

40

【0082】

同様に、ノーザン分析により種子登熟過程での7crp遺伝子の発現パターンを調査した。7crp mRNAの発現レベルは開花後15日目でピークになり、その後減少することが示された。この発現パターンは7crp遺伝子の発現に用いたグルテリン遺伝子プロモーターときわめて類似していた(図5)。また、タンパク質同様、他の組織での発現はmRNAレベルでも検出されなかった。

【0083】

次に、pGluBsig7CrpKDEL 10番の種子におけるT細胞エプトープ連結ペプチドの発現部位を解析するため、登熟種子を胚、胚乳、穎に分離した後、それぞれの

50

画分からタンパク質を抽出して、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、T細胞エピトープ連結ペプチドのシグナルは、胚乳にのみ検出され、胚、穎、葉から抽出した試料ではシグナルは検出されなかった(図6)。また、形質転換体種子の断面切片を調製して特異抗体を用いた組織免疫染色解析を行ったところ、やはりT細胞エピトープ連結ペプチドのシグナルは、胚乳にのみ検出され、胚では検出されなかった。これらのことから、T細胞エピトープ連結ペプチドは、形質転換体種子の胚乳に特異的に蓄積されることが確認された。これらの結果は、G l u B - 1タンパク質や、G l u B - 1プロモーターとシグナル配列を用いた外来タンパク質の発現部位と一致することから、本発明で作出したT細胞エピトープ連結ペプチドの発現系においても、G l u B - 1プロモーターの特性が発揮されていることが示された。

10

【0084】

また、世代が進んだ形質転換体種子におけるT細胞エピトープ連結ペプチドの蓄積量の変化の有無を検討する目的で、p G l u B s i g 7 C r p K D E L形質転換体1番、10番、17番の系統それぞれについて T 1、T 2、T 3 完熟種子を回収し、種子から抽出したタンパク質に対するウェスタンブロット解析を行った。その結果、1番、10番、17番全ての系統について、T 1、T 2、T 3 種子でT細胞エピトープ連結ペプチドのシグナルに変化は認められなかった。このことから、形質転換体の世代が進んでも、T細胞エピトープ連結ペプチドは種子で生産され、その集積量は変化しないことが分かった(図7)。

【0085】

20

〔実施例5〕 イネ種子で発現するT細胞エピトープ連結ペプチド産物の特性
T細胞エピトープ連結ペプチドを最も多く集積するp G l u B s i g 7 C r p K D E L形質転換体10番の種子を対象として、沸騰水中で20分間加熱処理したときの種子中のT細胞エピトープ連結ペプチドの安定性を検討した。ウェスタンブロット解析によりT細胞エピトープ連結ペプチドのシグナルを比較した結果、加熱処理の前後で変化は認められなかった(図8)。このことから、炊飯器などでイネ種子を炊飯した後も、種子中に集積したT細胞エピトープ連結ペプチドは安定であることが分かった。

【0086】

また、いくつかのアレルゲンタンパク質では、アレルゲンに結合している糖鎖がアレルギー反応を引き起こす主要な原因であることが指摘されている。本発明で研究対象としているスギ花粉アレルゲン由来のT細胞エピトープ連結ペプチドの場合、一次構造配列上典型的なN-型糖鎖結合配列は存在しないことから、糖鎖は結合していないと考えられる。そこで、イネ種子で生産されたT細胞エピトープ連結ペプチドに対して、糖鎖が結合していないことをペプチドレベルで確かめる実験を行った。

30

【0087】

エンドグリコシダーゼは、N-型糖鎖の結合部に作用して糖鎖を遊離する活性を持つ酵素であり、N-型糖鎖の解析に用いられている。N-型糖鎖が結合している場合は、エンドグリコシダーゼによりタンパク質から糖鎖が遊離されるため、反応の前後でタンパク質の分子量が変化する。そこで、イネの種子からT細胞エピトープ連結ペプチドを含むタンパク質画分を抽出してエンドグリコシダーゼと反応させ、ウェスタンブロットによりT細胞エピトープ連結ペプチドの分子量を解析した。その結果、エンドグリコシダーゼ反応前後でT細胞エピトープ連結ペプチドの分子量に変化が認められなかった(図9)。このことから、イネ種子で生産されたT細胞エピトープ連結ペプチドに対して、N-型糖鎖が結合していないことが示された。

40

【0088】

一方、p G l u B s i g 7 C r p K D E L形質転換体種子中に集積したT細胞エピトープ連結ペプチドのN末端アミノ酸残基の同定を目的として、種子タンパク質を抽出して二次元電気泳動により分離してP V D F膜に転写した後、特異抗体によりT細胞エピトープ連結ペプチドのシグナルを検出した。その結果、T細胞エピトープ連結ペプチドは塩基性タンパク質としての挙動を示した。この結果は、T細胞エピトープ連結ペプチドのアミノ酸

50

配列から求められる推定等電点が 9.76 であることと符合する。

【0089】

このT細胞エピトープ連結ペプチドのスポットを回収して、N末端アミノ酸配列解析を依頼した。その結果、N末端アミノ酸残基の同定は困難であり、N末端が修飾を受けていることが示唆された。そこで、被修飾末端を解析する方法として現在使用可能な試薬である、N-ホルミル基、N-ピログルタミル基、N-アセチル基それぞれの修飾基を特異的に遊離する酵素を利用して、それぞれの修飾基を除去した後、N末端アミノ酸配列解析を行うことにより、N末端残基の同定を試みた。しかし、T細胞エピトープ連結ペプチドのN末端のアミノ酸残基を同定することはできなかった。このことから、種子中のT細胞エピトープ連結ペプチドのN末端は、ホルミル基、ピログルタミル基、アセチル基以外の修飾を受けていることが示唆された。

10

【0090】

〔実施例6〕 T細胞エピトープ連結ペプチド発現系の導入によるイネアレルゲンタンパク質への影響

pGlubsig7CrpKDELの導入による種子の主要アレルゲンタンパク質への影響を調べるため、これらのアレルゲンに対する特異抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、非形質転換体種子と比較して、pGlubsig7CrpKDEL 10番の種子では、グルテリンAの前駆体の増加及び14 - 16 kアレルゲンタンパク質の減少が認められた。現在、これらの差異が認められる理由は不明である。その他のアレルゲン(26kおよび33k グロブリン)に対する抗体を使用した場合には、アレルゲンタンパク質のシグナルに認められるような変化はなかった(図10)。

20

【0091】

〔実施例7〕 ADPグルコースピロホスホリラーゼプロモーターによるT細胞エピトープ連結ペプチドの集積

スギ花粉アレルゲンT細胞エピトープ連結ペプチドをイネ種子中で発現させるための発現プラスミドを作製した。ADPグルコースピロホスホリラーゼのプロモーター、シグナル配列とT細胞エピトープペプチドを連結した後、KDEL配列、Nos-T配列を3'末端に付加することにより、発現プラスミドpAGPase sig7CrpKDELを構築した。プラスミドの構造を図11上段に示す。

【0092】

次に、7crp遺伝子の発現パターンを調査したところ、種子の胚乳および胚又は維管束でも発現し、器官としては種子で最も強く発現したことから、ADPグルコースピロホスホリラーゼプロモーターを用いても、種子で蓄積できることが分かった。

30

【0093】

次に、得られた形質転換体完熟種子中の7crpの集積量を、実施例2と同様にウェスタンブロットにより解析した。図11中段に7Crp集積量の定量結果を示す。2.3 k Glub-1プロモーターを用いた場合に比べて7Crpの集積量は減少していたが、多くの系統で7Crpの集積が認められた。また、T0世代形質転換体の登熟期種子における7Crp遺伝子の転写産物を、ノーザン解析により検討した。結果を図11下段の写真に示す。

40

【0094】

上記よりグルテリンプロモーター以外のプロモーター(種子の胚乳および胚、または維管束でも発現し、器官としては種子で最も強く発現)を用いた場合であっても、本発明の集積方法を実施することが可能であることが示された。

【0095】

〔実施例8〕 可変領域へ2個の7crpを挿入した貯蔵タンパク質の集積
グルテリンGlubA-2遺伝子のcDNAクローンpREE99の可変領域に、2個の7crpペプチドを直列に挿入し発現させた。図12上段に、プラスミドpREE99 2x7Crpの構造を示す。

【0096】

50

次に、得られた形質転換体完熟種子における7Crpの集積量を、実施例2と同様にウエストンプロットにより定量した。可変領域に挿入された2個の7Crpは、グルテリンの一部として集積した。結果を図12中段に示す。また、T0世代形質転換体の登熟期種子におけるpREE99に挿入された7Crp遺伝子の転写産物をノーザン解析により検討した。結果を図12下段の写真に示す。

【0097】

【発明の効果】

本発明により、スギ花粉症を緩和（治療）する効果を持つT細胞エピトープ連結ペプチドのイネ種子における生産に成功した。本発明の成果によって、現在行われている化学合成法を用いたT細胞エピトープ連結ペプチド合成系や大腸菌での合成よりも、より低コストでの生産が可能になる。

10

【0098】

種子中に蓄積されたT細胞エピトープペプチドは室温で貯蔵されても極めて安定である（1年以上）。また生産量の制御も容易である。また特別な施設も必要とせず、圃場のみである。さらに、日常の食生活を通じて経口摂取することにより、従来行われてきた皮下注射等による投与に必要な費用、医療費を省くことができ、より低コストでT細胞エピトープ連結ペプチドを投与することが可能になる。これらの利点を持つイネ種子生産システムを活用することにより、アレルギー疾患に対するワクチンや生活習慣病を緩和するペプチドなど、医学的に有用な成分をより低コストで生産して供給するという、新しい事業の創出も期待される。

20

【0099】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences

<120> Method of accumulating allergen-specific T-cell epitopes in plants
and engineering transgenic plants accumulating T-cell epitopes

<130> MOA-A0217

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys

1

5

10

15

Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys

20

25

30

Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser

10

20

30

40

35

40

45

Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro
 50 55 60

Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe
 65 70 75 80

10

Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg
 85 90 95

<210> 2

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys
 1 5 10 15

30

Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys
 20 25 30

Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser
 35 40 45

Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro
 50 55 60

40

Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe
 65 70 75 80

Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg
 85 90 95

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys
 100 105 110

Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys
 115 120 125

Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser
 130 135 140

Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro
 145 150 155 160

Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe
 165 170 175

Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg
 180 185 190

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

10

20

30

40

<213> *Oryza sativa*L. cv *Manngetsumochi*

<400> 3

Met Ala Ser Ser Val Phe Ser Arg Phe Ser Ile Tyr Phe Cys Val Leu

1

5

10

15

Leu Leu Cys His Gly Ser Met Ala

10

20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*L. cv *Manngetsumochi*

20

<400> 4

Met Ala Ser Ile Asn Arg Pro Ile Val Phe Phe Thr Val Cys Leu Phe

1

5

10

15

Leu Leu Cys Asp Gly Ser Leu Ala

30

20

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*L. cv *Manngetsumochi*

40

<400> 5

Met Ala Ser Lys Val Val Phe Phe Ala Ala Ala Leu Met Ala Ala Met
 1 5 10 15

Val Ala Ile Ser Gly Ala Gln
 20

10

<210> 6

<211> 3350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 constructed DNA sequence

20

<220>

<221> CDS

<222> (2333)..(2713)

<400> 6

30

acagattctt gctaccaaca acttcacaaa gtagtagtca accaaaacta tgctaaggaa 60

tcacctcact tccgcccattg accgtgagca cgactgttca aacagtttgt taatctctac 120

aaagaaggta cactttacct acacaacgcc actaacctga gttaccacgc ccatgcaaaa 180

tagccacgtc ttgtgactta agggatttcg cgacaaggca tttcgaaagc ccacacaagg 240

40

acacctatg aaaactggag ggggccaca gaccaacaac aagttaggtc ccaaccaatg 300

tigigccagg aaaaatccaa ggggtcctcc ccaacaccac cccgacaaat ccactigtcc 360

atggcaica agattigcct gacctagcta attactcagc caggcatgtc acaattcacc 420

catgiggica cacatgitat ggttggatga aattctaaag gaatcggicc atatgagcaa 480

10

gaccgagaaa ccataccacc agtacttcta ccgaaatagc agtttagtaa actcattigt 540

titcaaggca cccgaccag gtgtgtcggg tttccaggg attttgtaa cccaagtttt 600

acccatagtt gatcattcaa atttgagga gggtcattgg tatccgtacc tgagggcacg 660

20

aatacigaga cctagcattg tagtcgacca aggaggtaa tgcagcaatt gtaggtgggg 720

ccigtiggtt atatigcaa ctgcggccaa catticatgt gtaattaga gatgtgcatt 780

tigagaaatg aaatacttag titcaaatta tgggctcaa ataataaag gtgacctacc 840

tigctigata tctigagctt ctctctgta tccgcgcac taggactctt ctggctccga 900

30

agctacacgt ggaacgagat aactcaaca aacgaccaag gaaaagctcg tattagttag 960

tactaagigt gccactgaat agatctgat tttgaggaa ttttagaagt tgaacagagt 1020

caatcgaaca gacagttgaa gagatatgga ttttctaaga ttaattgatt ctctgtataa 1080

40

agaaaaaaag tattattgaa ttaaatggaa aaagaaaaag gaaaaagggg atggcttctg 1140

cttttgggc tgaaggcggc gtgtggccag cgtgctgcgt gcggacagcg agcgaacaca 1200
cgacggagca gctacgacga acgggggacc gagtggaccg gacgaggatg tggcctagga 1260
cgagtgcaca aggctagtgg actcggtecc cgcgcggtat cccgagtggc ccactgtctg 1320
caaacacgat tcacatagag cgggcagacg cgggagccgt cctaggtgca ccggaagcaa 1380
atccgtcggc tgggtggatt tgagtgcac ggcccacgtg tagcctcaca gctctccgtg 1440
gtcagatgtg taaaattatc ataatagtg tttttcaat agttaaataa tatatatagg 1500
caagttatat gggtaataa gcagtaaaaa ggcttatgac atggtaaaat tacttacacc 1560
aatatgccct actgtctgat atattttaca tgacaacaaa gttacaagta cgtcatttaa 1620
aaatacaagt tacttatcaa ttgtagtgtg tcaagtaaat gacaacaaac ctacaaattt 1680
gctattttga aggaacactt aaaaaaatca ataggcaagt tatatagica ataaactgca 1740
agaaggccta tgacatggaa aaattacata caccaatag ctttattgtc cggtatattt 1800
tacaagacaa caaagttata agtatgtcat ttaaaaatac aagttactta tcaattgtca 1860
agtaaatgaa acaaaccta caaatttgtt atttigaagg aacacctaaa ttatcaaata 1920
tagcttgcta cgcaaaatga caacatgctt acaagttatt atcatcttaa agttagactc 1980

10

20

30

40

atcttctcaa gcataagagc tttatgggtgc aaaacaaat ataatgacaa ggcaaagata 2040

catacatatt aagagtatgg acagacattt cttaacaaa ctccatttgt attactccaa 2100

aagcaccaga agtttgtcat ggctgagtca tgaatgtat agttcaatct tgcaaagtig 2160

ctttccitt tgtacttgtt tttaacacta caagccatat attgtctgta cgtgcaacaa 2220

10

actatacac caigtatccc aagatgcitt tttattgcta tataaactag ctgggtctgt 2280

cttgaactc acatcaatta gcittaagttt ccataagcaa gtacaaatag ct atg gcg 2338

Met Ala

1

20

agt tcc ggt ttc tct cgg ttt tct ata tac ttt tgt gtt ctt cta tta 2386

Ser Ser Gly Phe Ser Arg Phe Ser Ile Tyr Phe Cys Val Leu Leu Leu

5

10

15

igc cac ggt tct atg gcc cag ccc atg ggc atc atc gca gct tac caa 2434

Cys His Gly Ser Met Ala Gln Pro Met Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln

20

25

30

30

aat cca gca agc tgg aag agt atg aag gtt aca gtt gca ttc aac caa 2482

Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln

35

40

45

50

ttc ggt cct gat atc ttt gct agc aag aat ttc cac ctc cag aaa aat 2530

Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn

55

60

65

40

aag ctc aca agt ggc aag att gca agc tgc ttg aac tat gga ttg gtt 2578
 Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr Gly Leu Val
 70 75 80

cat gta gct aac aat aac tat gat cca agc ggt aag tat gag ggt ggc 2626
 His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Gly 10
 85 90 95

aac atc tac act aag aag gaa gca ttc aac gta gag caa ttt gca aag 2674
 Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Gln Phe Ala Lys
 100 105 110

ctc aca ggc ttc act ctc atg gga cgc aag gac gag ttg aagagctctg 2723 20
 Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg Lys Asp Glu Leu
 115 120 125

taattgagaa ctagtatcgg cgtagagtaa aataaaacac cacaagtatg acacttgggtg 2783

gtgattcigt tcgatatcag tactaaataa aggttacaaa cttcttaatt ttctacttc 2843 30

atgccaatgga tattccatta tggactatag tggacagggc cggctctatga ttttgagggc 2903

cctaggaact catcgcgatg ggcctcaagc tatatataaa atttattgat atatatagac 2963

gctaatttta ctgcaaaaat gaaaacaaat acatctatat attaaattta acattcctgg 3023

taattatcaa gaaataaaaat cgacccaaaat aacaatatat ttgtaacttg gaactaatat 3083 40

aattatttat taacttaatg aagaatagaa ccccgtcata tccattgctt cctatgaaaa 3143

gatacttctt cgggtatttc ttgatgcaaa atcataaaga acggtattaa gatcaatagt 3203

gtccaagata tccitctcga ttgagcacat agccaagcca titaaccita ttgctgacag 3263

ttgatctcaa atagtitttc aacaacttca attttgataa acttatttca gctgaagcta 3323

ccatcatagg taaagttaag agaattc 3350

10

<210> 7

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<400> 7

Met Ala Ser Ser Gly Phe Ser Arg Phe Ser Ile Tyr Phe Cys Val Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Cys His Gly Ser Met Ala Gln Pro Met Gly Ile Ile Ala Ala
 20 25 30

30

Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe
 35 40 45

Asn Gln Phe Gly Pro Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln
 50 55 60

40

Lys Asn Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Tyr Gly
 65 70 75 80

Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly Lys Tyr Glu
 85 90 95

Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val Glu Gln Phe
 100 105 110

10

Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Arg Lys Asp Glu Leu
 115 120 125

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のベクター pGluBsig7CrpKDELによる形質転換体における7Crpの発現解析結果を示す図および写真である。上図は、プラスミド pGluBsig7CrpKDELの構造を示す図である。グルテリンGluB-1遺伝子の2.3kプロモーターの制御により7Crpが発現する。中図は、得られた形質転換体完熟種子における7Crp集積量の定量結果を示す図であり、系統番号#1、#10、#15、#17、#31、#34番などの種子で比較的高い集積量が認められる。下図は、T0世代の形質転換体の登熟期種子（開花後15日ころ）における7Crp遺伝子の転写産物を解析したノーザン解析の結果を示す写真である。 20

【図2】本発明のベクターpGluBsig7Crpによる形質転換体における7Crpの発現解析結果を示す図および写真である。上図は、プラスミドpGluBsig7Crpの構造を示す図であり、7Crpの3'末端にKDEL配列は付加されていない。中図は、得られた形質転換体完熟種子における7Crp集積量の定量結果を示す図である。図1の7Crp3'末端にKDEL配列を付加した場合に比べて、7Crpの集積量が減少している。下図は、T0世代形質転換イネ登熟期種子における7Crp遺伝子の転写産物を解析したノーザン解析の結果を示す写真である。 30

【図3】本発明のベクターpGluBsig7CrpKDELによる形質転換体のゲノムDNAのサザン解析の結果を示す写真である。非形質転換体イネおよび系統番号#1、#10、#17、#34番形質転換体の葉から抽出したゲノムDNA(10μg)を、制限酵素SacIで消化し、0.9%(w/v)アガロース電気泳動により分離した後、ナイロン膜へ転写した。その後、ラジオアイソトープで標識した7Crp遺伝子全長DNAをプローブとして7Crp遺伝子の検出を行った。

【図4】ウェスタン解析による種子登熟過程でのグルテリンと7Crpペプチドの発現パターンを示す写真である。本発明のベクターpGluBsig7CrpKDELによる形質転換体#10番の種子の全蛋白質を、開花後5、10、15、20、25日の時点で抽出して、SDS-PAGEにより分離し、PVD膜へ転写した。その後、抗グルテリン抗体あるいは抗7Crp抗体を用いて、グルテリンあるいは7Crpペプチドを検出した。 40

【図5】ノーザン分析による種子登熟過程でのグルテリン遺伝子と7Crp遺伝子の発現パターンを示す写真である。本発明のベクターpGluBsig7CrpKDELによる形質転換体#10番の種子、葉、茎それぞれの全RNAを抽出して、アガロース電気泳動により分離し、ナイロン膜へ転写した。その後、ラジオアイソトープで標識したグルテリンあるいは7Crp遺伝子全長DNAをプローブとして、グルテリンあるいは7 50

C r p の転写産物を検出した。上図では 25 S および 17 S の r R N A が可視化され、中図ではグルテリン、下図では 7 C r p の転写産物の解析結果が示されている。

【図 6】本発明のベクター p G l u B s i g 7 C r p K D E L による形質転換体 # 10 番の種子中における 7 C r p ペプチドの集積部位の解析結果を示す写真である。左図は、胚乳、胚、穎、葉それぞれから抽出した蛋白質画分に対する抗 7 C r p 抗体を用いたウェスタン解析の結果を示す。右図では、抗 7 C r p 抗体を用いた登熟種子断面の組織免疫染色の結果が示されている。7 C r p のシグナルを可視化するため、抗ウサギ I g G アルカリフォスファターゼ標識抗体を用いた。

【図 7】本発明のベクター p G l u B s i g 7 C r p K D E L による形質転換体の T 1、T 2、T 3 世代の種子における 7 C r p ペプチドの集積量を比較した結果の写真である。ホモ接合体として選抜し、生育させた形質転換体（系統番号 # 1 - 3、# 10 - 1、# 10 - 4、# 17 - 1）について、それぞれの世代の種子から全蛋白質を抽出して抗 7 C r p 抗体を用いたウェスタン解析を行った。

【図 8】本発明のベクター p G l u B s i g 7 C r p K D E L による形質転換体種子に集積した 7 C r p ペプチドの熱処理に対する安定性を解析した結果を示す写真である。形質転換体系統番号 # 10 の種子を沸騰水中で 20 分間加熱した後、全蛋白質を抽出して S D S - P A G E で分離した。対照として、熱処理を行わない種子の全蛋白質を分離した。左図では C B B を用いて蛋白質を可視化し、右図では抗 7 C r p 抗体を用いたウェスタン解析により 7 C r p を検出した。

【図 9】本発明のベクター p G l u B s i g 7 C r p K D E L による形質転換体種子に集積した 7 C r p ペプチドに対する N - 結合型糖鎖の解析結果を示す写真である。まず、形質転換体系統番号 # 10 の種子から抽出した全蛋白質画分を N - グリコシダーゼ F と反応させた。グリコシダーゼ反応のコントロール基質として、N - 結合型糖蛋白質であるトランスフェリンおよびリボヌクレアーゼ B を用いた。次に、酵素との反応の前後での基質分子量的変化を S D S - P A G E により解析した。左図では抗 7 C r p 抗体を用いたウェスタン解析により、右図では C B B を用いた染色により、7 C r p ペプチドや基質蛋白質の可視化を行った。

【図 10】7 C r p ペプチドの発現によるイネアレルギー蛋白質の発現への影響を解析した結果を示す写真である。非形質転換体イネおよび形質転換体系統番号 # 10 の種子から抽出した全蛋白質を S D S - P A G E で分離した後、イネアレルギー蛋白質それぞれを特異的に認識する抗体を用いたウェスタン解析により、アレルギー蛋白質を検出した。

【図 11】本発明のベクター p A G P a s e s i g 7 C r p K D E L による形質転換体における 7 C r p の発現解析結果を示す図および写真である。上図は、プラスミド p A G P a s e s i g 7 C r p K D E L の構造を示す図であり、7 C r p の発現は A D P グルコースピロホスホリラーゼのプロモーターにより制御される。中図は、得られた形質転換体完熟種子における 7 C r p 集積量の定量結果を示す図である。2 . 3 k G l u B - 1 プロモーターを用いた場合に比べて 7 C r p の集積量は減少しているが、多くの系統で 7 C r p の集積が認められる。下図は、T 0 世代形質転換体の登熟期種子における 7 C r p 遺伝子の転写産物を解析したノーザン解析の結果である。

【図 12】本発明のベクター p R E E 9 9 2 x 7 C r p による形質転換体における 7 C r p の発現解析結果を示す図および写真である。上図は、プラスミド p R E E 9 9 2 x 7 C r p の構造を示す図である。グルテリン G l u A - 2 遺伝子の c D N A クローン p R E E 9 9 の可変領域へ、2 個の 7 C r p が直列に挿入されている。中図は、得られた形質転換体完熟種子における 7 C r p 集積量の定量結果を示す図であり、可変領域に挿入された 2 個の 7 C r p はグルテリンの一部として集積する。下図は、T 0 世代形質転換体の登熟期種子において p R E E 9 9 に挿入された 7 C r p 遺伝子の転写産物を解析したノーザン解析の結果である。

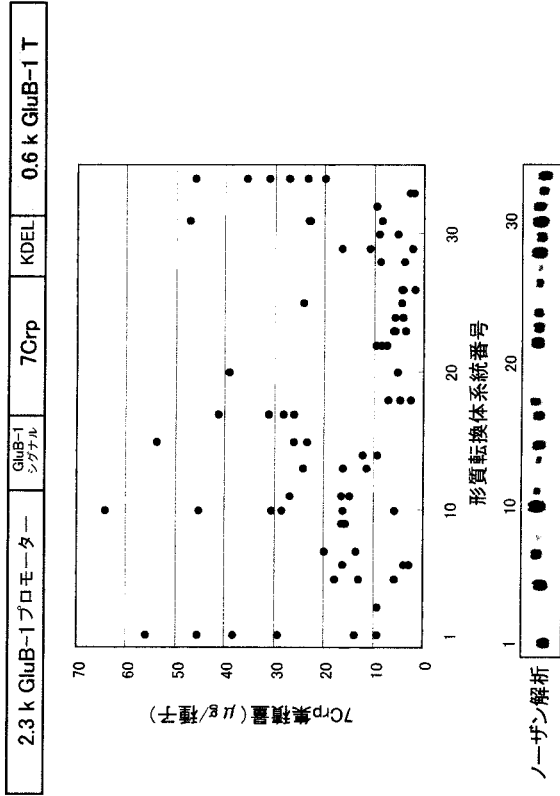
10

20

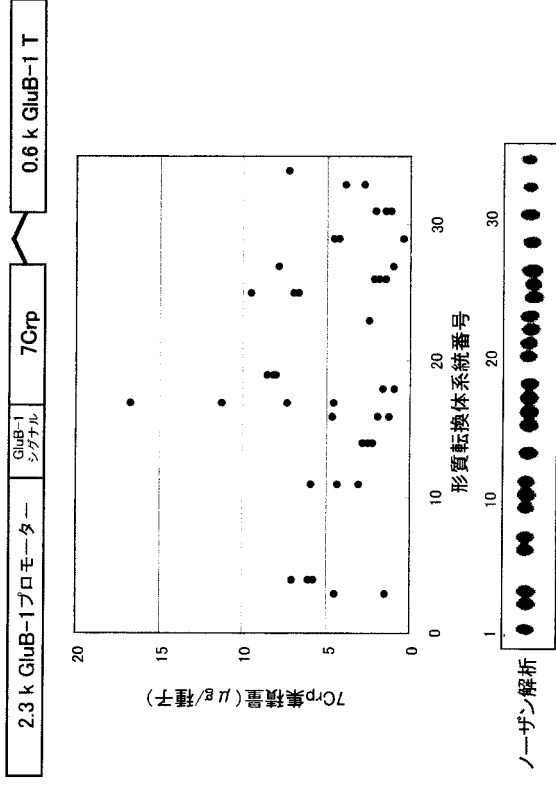
30

40

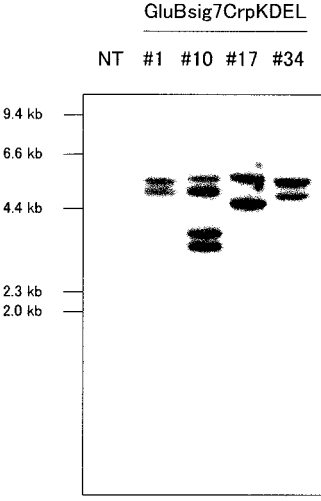
【 図 1 】



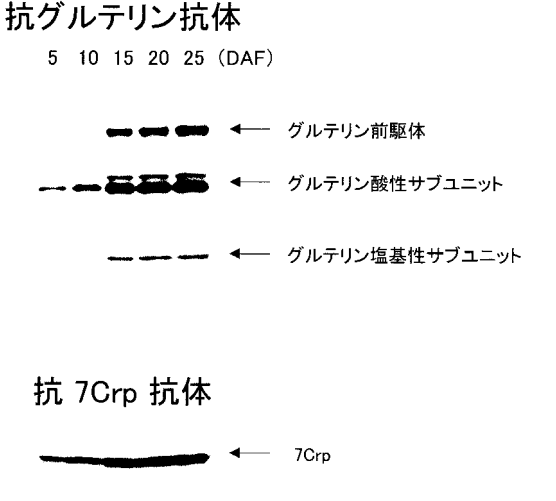
【 図 2 】



【 図 3 】

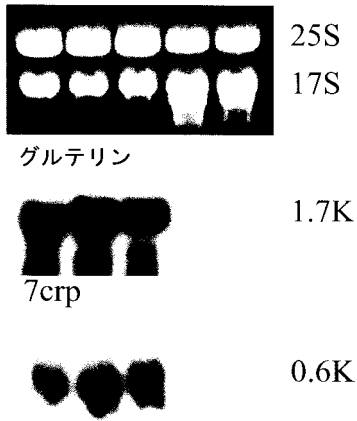


【 図 4 】



【図 5】

種子 (DAF) 葉 茎
10 15 20

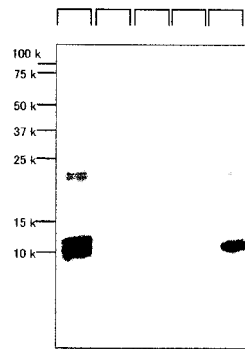


【図 6】

ウエスタンブロット

非形質転換体

胚乳胚 穎 葉 C



形質転換体 #10



【図 7】

形質転換体種子

#1-3			#10-1			#10-4			#17-1		
T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃

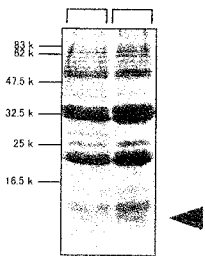


【図 8】

SDS-PAGE

抗 7 連結ペプチド

熱処理

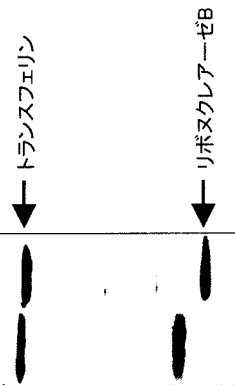


【図 9】

コントロール実験

N-グリコシダーゼ F

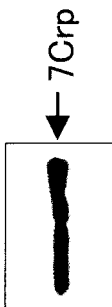
+
-



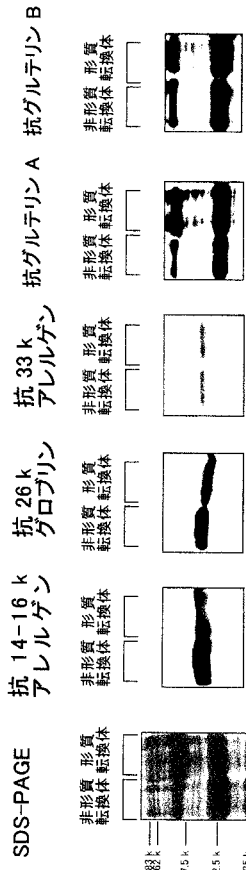
形質転換体種子

N-グリコシダーゼ F

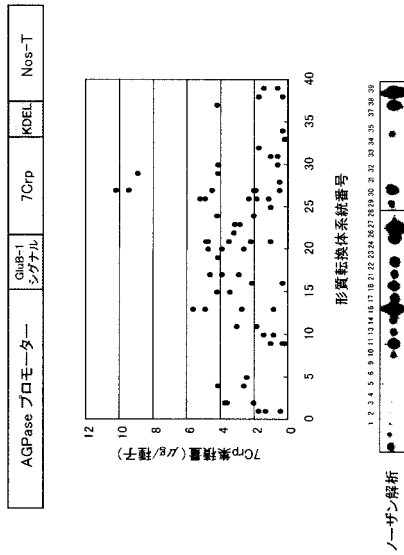
+
-



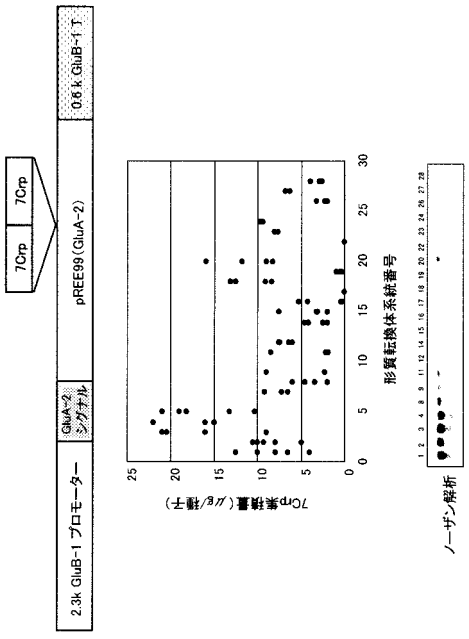
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA08 BA31 CA01 DA01 GA11
4B065 AA88X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45 CA53
4C088 AB74 AC04 MA52 NA14 ZA33 ZA34 ZB13