

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6566536号  
(P6566536)

(45) 発行日 令和1年8月28日(2019.8.28)

(24) 登録日 令和1年8月9日(2019.8.9)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 N 15/11 (2006.01)** C 1 2 N 15/11 Z N A Z  
**C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)** C 1 2 Q 1/6876 Z

請求項の数 2 (全 13 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2014-123214 (P2014-123214)</p> <p>(22) 出願日 平成26年6月16日 (2014.6.16)</p> <p>(65) 公開番号 特開2016-2018 (P2016-2018A)</p> <p>(43) 公開日 平成28年1月12日 (2016.1.12)</p> <p>審査請求日 平成29年1月18日 (2017.1.18)</p> <p>(出願人による申告) 平成23年度、独立行政法人科学技術振興機構、研究成果展開事業 研究成果最速展開支援プログラム、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願</p>	<p>(73) 特許権者 304020177 国立大学法人山口大学 山口県山口市吉田1677-1</p> <p>(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀</p> <p>(74) 代理人 100102255 弁理士 小澤 誠次</p> <p>(74) 代理人 100096482 弁理士 東海 裕作</p> <p>(74) 代理人 100188352 弁理士 松田 一弘</p> <p>(74) 代理人 100131093 弁理士 堀内 真</p> <p>(74) 代理人 100150902 弁理士 山内 正子</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フォワードプライマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

目的遺伝子の発現を向上させる配列をTATAボックス配列及び前記目的遺伝子配列の上流に連結するためのフォワードプライマーであって、以下の(a)に示される塩基配列、及び前記TATAボックス配列の5'末端より上流側の塩基配列とアニールする配列からなり、長さ40~100塩基の前記フォワードプライマー。

(a) 配列番号2~8のいずれかに示される塩基配列

【請求項2】

(a)に示される塩基配列が、配列番号2~6、8のいずれかに示される塩基配列であることを特徴とする請求項1記載のフォワードプライマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プロモータ活性を有する配列が目的遺伝子配列の上流に連結した線状二本鎖DNAを作製するためのフォワードプライマーに関する。

【背景技術】

【0002】

様々なタンパク質を細胞に発現させる技術は、細胞内におけるタンパク質の機能解析や有用タンパク質の生産などにおいて広く用いられており、今日では欠かせない技術である。細胞内で目的遺伝子などを発現させるには、プロモータ配列と目的遺伝子配列とターミ

ネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを作製し、かかるDNAコンストラクトを細胞に導入する方法が一般的である。この方法を用いる場合には、プロモータ配列を目的遺伝子配列の上流に連結する必要がある。

【0003】

現在、DNAを連結するために最も一般的に用いられている方法は、DNAリガーゼを用いて、平滑末端を有するDNA分子同士又は相補的な突出末端を有するDNA分子同士を結合させるものである。しかし、かかる方法は、制限酵素処理とDNAリガーゼによるDNAの連結という複雑な*in vitro*操作を必要としていた。

【0004】

特許文献1には、目的遺伝子配列、発現マーカー配列及びポリアデニレーションシグナル配列から構成されるDNA断片をPCRにより作製する方法が提案されている。この特許文献1記載の方法を用いれば、プロモータ配列の下流に目的遺伝子配列を連結することが可能となるが、プロモータ配列の3'末端及び目的遺伝子配列の5'末端に制限酵素サイト或いはアニーリング配列をそれぞれ組み込む必要があった。

10

【0005】

また、特許文献2には、特定のターミネータ配列を含む(ターミネータ能力を有する)高発現用リバースプライマーを用いて、プロモータ配列、目的遺伝子配列、特定のターミネータ配列を順次備えた線状二本鎖DNAをPCRにより作製する方法が提案されている。この特許文献2の方法を用いれば、制限酵素処理やライゲーションをすることなく、ターミネータ能力を有するリバースプライマーを用いることによって、ターミネータ能力を有する配列を目的遺伝子配列の下流に連結することが可能となるが、あくまで、ターミネータ能力を有する配列を目的遺伝子配列の下流に連結する方法であり、プロモータ活性を有する配列と目的遺伝子配列とをPCRのみで連結する方法の開発には至っていなかった。

20

【0006】

さらに、特許文献3には、2種類の標的DNA断片を融合させるために用いられる1組のプライマーを用いてオーバーラップエクステンションPCRを行うことにより、複数のDNA断片を融合させる方法が提案されている。この特許文献3の方法を用いれば、複数のDNA断片をPCRのみによって融合することが可能であるが、かかる方法に用いるプライマーはDNA断片を融合するためのプライマーであって、プロモータ配列を融合するためのものではなく、また、プロモータ活性を有するものでもなく、プロモータ配列を連結するにはプロモータ配列を含むDNA断片を調製する必要があった。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2004-141025号公報

【特許文献2】国際公開第2012/147370号パンフレット

【特許文献3】特開2009-268360号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0008】

本発明の課題は、制限酵素処理やライゲーションという煩雑な操作や、プロモータ配列を含むDNA断片の調製が不要であって、PCRによって、プロモータ活性を有する配列を目的遺伝子配列の上流に連結することが可能なフォワードプライマーを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、プロモータ活性を有する配列をプライマーに含有させることができれば、プロモータ配列を含むDNA断片を調製することなく、PCRのみで、プロモータ配列を目的遺伝子配列の上流に連結することが可能と考えた。しかしながら、通常、プロモ-

50

タ配列は数百から数千塩基もの長さを有するため、プライマーに含有させることはできない。そこで、本発明者らは、プライマーに含有可能な短い配列で、かつプロモータ活性を有する配列があれば、プライマーにプロモータ活性を有する配列を含有させることができると考え、CMVプロモータの一部の配列を含有する様々なプライマーを作製してプロモータ活性を検討した。その結果、40～75塩基という非常に短く、かつ哺乳動物細胞実験において広く用いられているヒト翻訳伸長因子1-アルファ(EF1)プロモータと同等の高いプロモータ活性を有する配列を見いだした。さらに、かかる40～75塩基のプロモータ活性を有する配列を解析したところ、共通の配列を有していることを見だし、本発明を完成した。

#### 【0010】

すなわち、本発明は以下に開示されるとおりのものである。

(1) プロモータ活性を有する配列を目的遺伝子配列の上流に連結するためのフォワードプライマーであって、配列番号1に示される塩基配列を含む長さ30～150塩基からなるプロモータ活性を有する配列を備えたフォワードプライマー。

(2) プロモータ活性を有する配列が、ヒトサイトメガロウィルス(CMV)プロモータ由来の配列であることを特徴とする上記(1)記載のフォワードプライマー。

(3) プロモータ活性を有する配列が、以下の(a)～(c)のいずれかに示される塩基配列であることを特徴とする上記(1)記載のフォワードプライマー。

(a) 配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列；

(b) 配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列；

(c) 配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列との同一性が90%以上の塩基配列；

(4) プロモータ活性を有する配列が目的遺伝子配列の上流に連結した線状二本鎖DNAであって、前記プロモータ活性を有する配列が、配列番号1に示される塩基配列を含む長さが30～150塩基からなるプロモータ活性を有する配列であることを特徴とする線状二本鎖DNA。

#### 【発明の効果】

#### 【0011】

本発明のフォワードプライマーによると、制限酵素処理やライゲーションという煩雑な操作やプロモータ配列を含むDNA断片の調製が不要で、PCRのみによって、プロモータ活性を有する配列を目的遺伝子配列の上流に連結することが可能となる。かかるプライマーを用いれば、プロモータ配列を有さず、目的遺伝子配列を有する線状二本鎖DNAをテンプレートとしてPCRを行うことにより、プロモータ活性を有する配列を目的遺伝子配列の上流に備えた線状二本鎖DNAを作製することが容易となる。さらに、目的遺伝子配列の上流に既にプロモータ配列が連結している線状二本鎖DNAでも、目的遺伝子の発現が低い場合には、本発明のプライマーを用いて、目的遺伝子配列又は既存のプロモータ配列の上流に本発明のプライマーを用いてプロモータ活性を有する配列を連結させることで、目的遺伝子の発現をより向上させることが可能となる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1】本発明のフォワードプライマーを用いてPCRを行うことにより、プロモータ活性を有する配列を目的遺伝子配列の上流に連結する例を示す図である。

【図2】pKM138のマップを示す図である。

【図3】実施例1におけるPCRの概念を示す図である。

【図4】実施例1において、HEK293細胞に線状二本鎖DNAを導入し、24時間後に採取した培養上清に含まれる分泌型ルシフェラーゼの発光量を調べた結果を示す図である。

【図5】CMV(-80~-1)-hgluc-SVterのマップを示す図である。

【図6】実施例2において、HEK293細胞に線状二本鎖DNAを導入し、24時間後

10

20

30

40

50

に採取した培養上清に含まれる分泌型ルシフェラーゼの発光量を調べた結果を示す図である。

【図7】実施例3において、HEK293細胞に線状二本鎖DNAを導入し、24時間後に蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明のフォワードプライマーとしては、プロモータ活性を有する配列を目的遺伝子配列の上流に連結するためのフォワードプライマーであって、配列番号1に示される塩基配列を含む長さ30～150塩基からなるプロモータ活性を有する配列を備えたフォワードプライマーであれば特に制限されず、ここでプロモータ活性を有する配列とは、遺伝子の発現を目的とする配列（目的遺伝子配列）の上流に配置され、RNAポリメラーゼが結合することにより、下流に配置された遺伝子の発現を制御することができる塩基配列を意味する。

10

【0014】

また、本発明の線状二本鎖DNAとしては、プロモータ活性を有する配列が目的遺伝子配列の上流に連結した線状二本鎖DNAであって、前記プロモータ活性を有する配列が、配列番号1に示される塩基配列を含む長さが30～150塩基からなるプロモータ活性を有する配列であれば特に制限されず、かかる線状二本鎖DNAは本発明のフォワードプライマーを用いてPCRを行うことで容易に作製することが可能である。

【0015】

20

本発明において、プロモータ活性を有する配列とは、上述のように目的遺伝子の上流に配置した際に、目的遺伝子を発現させる機能を有する配列であれば特に制限されないが、例えば分泌型ルシフェラーゼの上流に配置した際に、EF1プロモータを用いた場合と比較して50%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは100%以上の分泌型ルシフェラーゼを発現させる能力を有する配列を挙げることができる。なお、EF1プロモータは哺乳動物細胞実験において広く用いられているプロモータであり、EF1プロモータと比較して少なくとも50%のプロモータ活性を有していれば、タンパク質を高発現させることが可能となる。

【0016】

上記プロモータ活性を有する配列としては、配列番号9に示されるヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモータ配列由来の配列であることが好ましく、以下の（a）～（c）のいずれかに示される塩基配列であることがより好ましい。

30

（a）配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列；

（b）配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列；

（c）配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列との同一性が90%以上の塩基配列；

【0017】

なお、配列番号1に示される塩基配列は、配列番号9に示されるCMVプロモータ配列における104番目～112番目、157番目～165番目、426番目～434番目、500番目～508番目に存在している。

40

【0018】

上記「1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列」としては、1～5個、より好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～3個、中でも1～2個、最も好ましくは1個の任意の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を挙げることができる。

【0019】

なお、配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列においては、配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列中の配列番号1に示す塩基配列以外が欠失、置換若しくは付加されているこ

50

ととなる。

【0020】

上記「配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列との同一性が90%以上」としては、配列番号2～8いずれかに示される塩基配列との同一性が90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上を挙げることができる。

【0021】

なお、配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列との同一性が90%以上である塩基配列においては、配列番号2～8のいずれかに示される塩基配列中に配列番号1に示す塩基配列と100%同一性を有する塩基配列が含まれていることとなる。

【0022】

上記プロモータ活性を有する配列の長さとしては、30～150塩基、好ましくは35～100塩基、より好ましくは35～80塩基、さらに好ましくは40～75塩基を挙げることができる。

【0023】

上記目的遺伝子としては、用途に合わせて全長の遺伝子でも、その一部でもよい。また、その由来はいかなる生物から単離された遺伝子でも、遺伝子工学的に作製された人工的な遺伝子でもよく、遺伝子における5'末端の開始コドン及び3'末端に停止コドンは、適宜、含んでも含まなくてもよい。

【0024】

本発明において、目的遺伝子配列の上流には、プロモータ配列や、シグナルペプチド又はタグペプチドをコードする配列や、TATAボックス等、いかなる配列を含んでもよく、目的遺伝子配列の下流には、ターミネータ配列や、タグペプチドをコードする配列等、いかなる配列を含んでもよい。

【0025】

上記シグナルペプチドとしては、ゴルジ体移行シグナルペプチド、細胞膜移行シグナルペプチド、ミトコンドリア移行シグナルペプチド、核移行シグナルペプチド、シナプス移行シグナルペプチド、核小体移行シグナルペプチド、核膜移行シグナルペプチド、ペルオキシソーム移行シグナルペプチド等を挙げることができ、タグペプチドとしては、FLAGタグペプチド、HAタグペプチド、MYCタグペプチド、GFPタグペプチド、MBPタグペプチド、GSTタグペプチド、HISタグ、SNAPタグ、ACPタグ、CLIPタグ、TAPタグ、V5タグ等を挙げることができる。

【0026】

上記ターミネータ配列としては、遺伝子発現を行う目的、目的遺伝子の種類等によって適宜選択することができ、シミアンウイルス40(SV40)ターミネータ配列等の天然に存在するターミネータ配列であっても、データベース上の配列に基づいて人工的に合成したターミネータ配列であってもよい。

【0027】

本発明において、フォワードプライマーとしては、配列番号1に示される塩基配列を含む長さ30～150塩基からなるプロモータ活性を有する配列を備えていればよく、プロモータ活性を有する配列と該プロモータ活性を有する配列以外の配列とを順次有しているものが挙げられ、かかる該プロモータ活性を有する配列以外の配列にはPCRのテンプレートとなる二本鎖DNAとアニールする配列が含まれる。

【0028】

テンプレートとして用いる二本鎖DNAが目的遺伝子を含む場合には、上記アニールする配列として、目的遺伝子の5'末端を含む塩基配列及び/又はかかる5'末端より上流側の塩基配列とアニールする配列とすることが好ましい。

【0029】

該プロモータ活性を有する配列以外の配列には、TATAボックスや、目的遺伝子の全部又は一部の配列や、シグナルペプチド又はタグペプチドをコードする配列を含んでもよく、かかる配列が前記アニールする配列となってもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 0 】

該プロモータ活性を有する配列以外の配列の長さとしては、12～150塩基、好ましくは15～100塩基、より好ましくは20～50塩基を挙げることができる。

## 【 0 0 3 1 】

本発明のフォワードプライマーは、ホスホアミダイド法やチオホスファイト法等の公知の方法で化学合成することが可能である。

## 【 0 0 3 2 】

本発明のフォワードプライマーを用いてPCRを行うことにより、プロモータ活性を有する配列を目的遺伝子配列に連結することが可能となる。PCRに用いるテンプレートとしては、環状の二本鎖DNAでも線状二本鎖DNAでもよい。

10

## 【 0 0 3 3 】

本発明のフォワードプライマーを用いてPCRを行うことにより、プロモータ活性を有する配列を線状二本鎖DNAに連結する例を以下に示す。

## 【 0 0 3 4 】

たとえば、図1(a)に示すように、目的遺伝子配列とターミネータ配列とを順次備えた二本鎖DNAをテンプレートとし、プロモータ活性を有する配列と、目的遺伝子配列の5'末端を含む塩基配列とアニールする配列とを含む本発明のフォワードプライマーと、ターミネータ配列の3'末端側にアニールするリバースプライマーを用いてPCRを行うことにより、目的遺伝子配列にプロモータ活性を有する配列を連結させ、プロモータ活性を有する配列と目的遺伝子配列とターミネータ配列とを備えた線状二本鎖DNAを作製することが可能となる。

20

## 【 0 0 3 5 】

また、図1(b)に示すように、目的遺伝子配列の5'末端より上流側の塩基配列と、目的遺伝子配列とターミネータ配列とを順次備えた二本鎖DNAをテンプレートとし、プロモータ活性を有する配列と、目的遺伝子配列の5'末端より上流側の塩基配列とアニールする配列とを含む本発明のフォワードプライマーと、ターミネータ配列の3'末端側にアニールするリバースプライマーを用いてPCRを行うことにより、目的遺伝子配列にプロモータ活性を有する配列を連結させ、プロモータ活性を有する配列と目的遺伝子配列の5'末端より上流側の塩基配列と目的遺伝子配列とターミネータ配列とを備えた線状二本鎖DNAを作製することが可能となる。

30

## 【 0 0 3 6 】

さらに、図1(c)に示すように、目的遺伝子配列を備えた二本鎖DNAをテンプレートとし、プロモータ活性を有する配列と、目的遺伝子配列の5'末端を含む塩基配列とアニールする配列とを含む本発明のフォワードプライマーと、特許文献2に記載されたターミネータ配列を含む高発現リバースプライマーを用いてPCRを行うことにより、目的遺伝子配列にプロモータ活性を有する配列を連結させ、プロモータ活性を有する配列と目的遺伝子配列とターミネータ配列とを備えた線状二本鎖DNAを作製することが可能となる。

## 【 実施例 1 】

## 【 0 0 3 7 】

(線状二本鎖DNAの作製)

図2に示すpKM138をテンプレート(最終濃度100pg/μl)として、配列番号10(EF1<sup>-</sup>-1100)に示されるフォワードプライマーと、配列番号11(pEGFP+1018c)に示されるリバースプライマーを用いてPCRを行い、EF1<sup>-</sup>プロモータ配列と、ルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子とSV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA(EF1<sup>-</sup>(-1100~-1)-hgluc-SVter)を作製した。次に、作製したEF1<sup>-</sup>(-1100~-1)-hgluc-SVterをテンプレート(最終濃度5pg/μl)として、表1に示すフォワードプライマーとリバースプライマーを用いてそれぞれ図3に示すようにPCRを行い、ルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子の開始コドン(ATG)のAを+1とし、EF1<sup>-</sup>プロモータ配列の3'末端を-1とした場合の上流側-1020~-1番目

40

50

の配列と、ルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と、SV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA (EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)の上流に、CMVプロモータ配列(配列番号9)の3'末端を-1とした場合の、上流側-500~-426番目の配列(配列番号2)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-500~-426)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-495~-426番目の配列(配列番号3)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-495~-426)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-475~-426番目の配列(配列番号4)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-475~-426)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-453~-414番目の配列(配列番号5)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-453~-414)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-130~-71番目の配列(配列番号6)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-130~-71)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-130~-61番目の配列(配列番号7)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-130~-61)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-120~-61番目の配列(配列番号8)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-120~-61)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-490~-461番目の配列(配列番号23)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-490~-461)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-430~-391番目の配列(配列番号24)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-430~-391)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、同上流側-90~-61番目の配列(配列番号25)を備えた線状二本鎖DNA (eCMV(-90~-61)-EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)、又はEF1プロモータ配列の3'末端を-1とした場合の上流側-1020~-1番目の配列を備えた線状二本鎖DNA (EF1 (-1020~-1)-hgluc-SVter)をそれぞれ作製した。

【0038】

【表1】

フォワードプライマー	リバースプライマー	PCR産物
CMVp-500-426-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号12	pEGFP+1018c (配列番号11)	eCMV(-500~-426)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
CMVp-495-426-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号13		eCMV(-495~-426)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
CMVp-475-426-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号14		eCMV(-475~-426)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
eCMV-453-414-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号15		eCMV(-453~-414)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
CMVp-130-71-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号16		eCMV(-130~-71)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
CMVp-130-61-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号17		eCMV(-130~-61)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
CMVp-120-61-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号18		eCMV(-120~-61)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
CMVp-490-461-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号19		eCMV(-490~-461)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
CMVp-430-391-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号20		eCMV(-430~-391)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
CMVp-90-61-EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号21		eCMV(-90~-61)-EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter
EF1 $\alpha$ p-1020 配列番号22		EF1 $\alpha$ (-1020~-1)-hgluc-SVter

【0039】

作製した線状二本鎖DNAの長さをアガロース電気泳動処理し、得られたPCR産物は、EF1プロモータ配列の3'末端を-1とした場合の上流側-1020~-1番目の配列と、ルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と、SV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAの上流に、配列番号2~8、23~25に示す塩基配列を備えたそれぞれの線状二本鎖DNAの長さであることを確認した。

【0040】

なお、EF1プロモータは哺乳動物細胞においてタンパク質を発現する際に用いられ

10

20

30

40

50

る高発現プロモータである。全長が1100塩基であり、3'末端を-1とした場合の上流側-1020~-1番目の配列(図3における-1020から-1までの1020塩基)はTATAボックスを有しているが、プロモータ活性をほとんど有さない。

#### 【0041】

PCRはGXL DNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)を用いてその推奨プロトコルに準じて行った。すなわち、1×bufferに最終濃度がフォワードプライマー0.3μM、リバースプライマー0.3μM、dNTP200μM、GXL DNAポリメラーゼ0.25Uとなるように混合し、98℃で4分反応させた後、98℃10秒、60℃15秒、68℃1.5分のサイクルを30回行った。PCRの条件については、後述の実施例においても同様である。

10

#### 【0042】

(細胞への導入及びルシフェラーゼの発光量の測定)

HEK293細胞を4000細胞/wellになるように96wellプレートにそれぞれ播種して18時間培養後、上記で得られたそれぞれの線状二本鎖DNAを、FuGENE(登録商標)HD Transfection Reagentキット(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)により細胞に導入した。そして、24時間後に採取した培養上清に含まれる分泌型ルシフェラーゼの発光量をBioLux Gaussia Luciferase assay kit(New England Biolabs社製)とCentro LB960(ベルトールド社製)を用いて測定することでプロモータ活性を評価した。結果を図4に示す。図中、横軸の数字は導入した線状二本鎖DNAの種類を表し、縦軸はルシフェラーゼの相対発光量RLU(counts/sec/μl)を表す。

20

#### 【0043】

(結果)

図4に示すように、eCMV(-500~-426)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-495~-426)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-475~-426)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-453~-414)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-130~-71)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-130~-61)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-120~-61)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVterを導入した場合は、EF1(-1020~-1)-hgluc-SVterを導入した場合と比較して顕著にルシフェラーゼ発光量が多く、EF1(-1100~-1)-hgluc-SVterを導入した場合と比較しても発現量はいずれも少なくとも60%以上、eCMV(-500~-426)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVterを導入した場合には100%以上であり、本発明のフォワードプライマーを用いることで、目的遺伝子配列の上流にプロモータ活性を有する配列を容易に連結することが可能であり、連結した配列は40~75塩基という短い配列でも高いプロモータ活性を有することが明らかとなった。

30

#### 【0044】

また、eCMV(-500~-426)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-495~-426)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-475~-426)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-453~-414)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-130~-71)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-130~-61)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-120~-61)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVterは、配列番号1に示す配列を共通に有していた。さらに、配列番号1に示す配列を2か所有するeCMV(-500~-426)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVterを導入した場合において最もプロモータ活性が高く、EF1プロモータの全長を備えたEF1(-1100~-1)-hgluc-SVterを導入した場合よりも高い活性を有していた。一方、配列番号1に示す配列を有していないeCMV(-490~-461)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-430~-391)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVter、eCMV(-90~-61)-EF1(-1020~-1)-hgluc-SVterを導入した場合はプロモータ活性が低かった。したがって、配列番号1に示される塩基配列がプロモータ活性に大きく関与していることが明らかとなった。

40

#### 【実施例2】

#### 【0045】

図5に示す、CMVプロモータ配列(配列番号9)の3'末端を-1とした場合の上流

50



側 - 80 ~ - 1 番目の配列と、ルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と SV40 ターミナー配列とを順次備えた線状二本鎖 DNA (CMV (-80 ~ -1) -hgluc-SVter) をテンプレート (最終濃度 5 pg / μl) として、配列番号 26 (eCMV453-414-80-1-hGluc+1) に示されるフォワードプライマーと配列番号 11 (pEGFP+1018c) に示されるリバースプライマーを用いて PCR を行い、CMV プロモータ配列の 3' 末端を - 1 とした場合の上流側 - 453 ~ - 414 番目の配列 (配列番号 5) と、同上流側 - 80 ~ - 1 番目の配列 (配列番号 27) と、ルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と、SV40 ターミナー配列とを順次備えた線状二本鎖 DNA (eCMV(-453 ~ -414) -eCMV(-80 ~ -1) -hgluc-SVter) を作製した。同様にコントロールとして、CMV (-80 ~ -1) -hgluc-SVter をテンプレート (最終濃度 5 pg / μl) として、配列番号 28 (eCMV-80) に示されるフォワードプライマーと配列番号 11 (pEGFP+1018c) に示されるリバースプライマーを用いて PCR を行い、eCMV(-80 ~ -1) -hgluc-SVter を作製した。

10

## 【0046】

作製した線状二本鎖 DNA の長さをアガロース電気泳動処理し、得られた PCR 産物は、CMV プロモータ配列の 3' 末端を - 1 とした場合の - 80 ~ - 1 番目の配列 (配列番号 27) と、ルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と、SV40 ターミナー配列とを順次備えた線状二本鎖 DNA の上流に、配列番号 5 に示す塩基配列を備えた線状二本鎖 DNA の長さであることを確認した。

## 【0047】

なお、CMV プロモータ配列の 3' 末端を - 1 とした場合の上流側 - 80 ~ - 1 番目の配列は TATA ボックスを有しているが、プロモータとしての機能をほとんど有さない配列である。

20

## 【0048】

(細胞への導入及びルシフェラーゼの発光量の測定)

HEK293 細胞を 4000 細胞 / well になるように 96 well プレートにそれぞれ播種して 18 時間培養後、上記で得られたそれぞれの線状二本鎖 DNA を実施例 1 と同様の方法で導入し、24 時間後に採取した培養上清に含まれる分泌型ルシフェラーゼを測定することでプロモータ活性を評価した。結果を図 6 に示す。図中、横軸の数字は導入した線状二本鎖 DNA の種類を表し、縦軸はルシフェラーゼの相対発光量 RLU (counts / sec / μl) を表す。

30

## 【0049】

(結果)

図 6 に示すように、eCMV(-453 ~ -414) -eCMV(-80 ~ -1) -hgluc-SVter を導入した場合でも、コントロールの eCMV(-80 ~ -1) -hgluc-SVter を導入した場合と比較して顕著にルシフェラーゼ発光量が多く、本発明のフォワードプライマーを用いることで、目的遺伝子配列の上流にプロモータ活性を有する配列を容易に連結することが可能であり、連結した配列はわずか 40 塩基という短い配列でも高いプロモータ活性を有することが明らかとなった。また、図 4 と図 6 の結果から、発現させる遺伝子の上流の DNA 配列の種類に関わらず、本発明のフォワードプライマーを用いて連結した配列は高いプロモータ活性を有することが明らかとなった。

40

## 【実施例 3】

## 【0050】

(線状二本鎖 DNA の作製)

プラスミド pTurboGFP-mito (Evrogen JSC 社製) をテンプレート (最終濃度 100 ng / μl) として、配列番号 28 に示すフォワードプライマー (eCMV-80) と配列番号 11 に示すリバースプライマー (pEGFP+1018c) を用いて 1 s t PCR を行い、CMV プロモータ配列の 3' 末端を - 1 とした場合の上流側 - 80 ~ - 1 番目の配列と、ミトコンドリア局在配列と GFP タンパク質をコードする遺伝子と、SV40 ターミナー配列とを順次備えた線状二本鎖 DNA (eCMV(-80 ~ -1) -mito-TurboGFP-SVter) を作製した。

## 【0051】

50

得られた 1 s t P C R 産物の eCMV(-80~-1)-mito-TurboGFP-SVter をテンプレート (最終濃度 5 p g / μ l ) として、配列番号 2 9 に示すフォワードプライマー ( eCMV453-414-eCMV-80 ) と配列番号 1 1 に示すリバースプライマー ( pEGFP+1018c ) を用いて 2 n d P C R を行い、配列番号 5 に示すプロモータ活性を有する配列と、 C M V プロモータ配列の 3 ' 末端を - 1 とした場合の上流側 - 8 0 ~ - 1 番目の配列と、ミトコンドリア局在配列と G F P タンパク質をコードする遺伝子と、 S V 4 0 ターミネータ配列とを順次備えた二本鎖 D N A ( eCMV(-453~-414)-eCMV(-80~-1)-mito-TurboGFP-SVter ) を作製した。

【 0 0 5 2 】

また、プラスミド pTurboGFP-mito ( Evrogen JSC 社製 ) をテンプレート (最終濃度 1 0 0 n g / μ l ) として、配列番号 3 0 に示すフォワードプライマー ( pEGFP-600 ) と配列番号 1 1 に示すリバースプライマー ( pEGFP+1018c ) を用いて P C R を行い、 C M V プロモータ全長の配列とミトコンドリア局在配列と G F P タンパク質をコードする遺伝子と S V 4 0 ターミネータ配列を順次備えた二本鎖 D N A ( CMVp full length-mito-TurboGFP-SVter ) を作製した。

10

【 0 0 5 3 】

作製した線状二本鎖 D N A の長さをアガロース電気泳動処理し、得られた P C R 産物は、配列番号 5 に示すプロモータ配列と、 C M V プロモータ配列の 3 ' 末端を - 1 とした場合の上流側 - 8 0 ~ - 1 番目の配列と、ミトコンドリア局在配列と G F P タンパク質をコードする遺伝子と、 S V 4 0 ターミネータ配列とを順次備えた二本鎖 D N A や、 C M V プロモータ全長の配列とミトコンドリア局在配列と G F P タンパク質をコードする遺伝子と S V 4 0 ターミネータ配列を順次備えた二本鎖 D N A の長さであることを確認した。

20

【 0 0 5 4 】

( 細胞への導入及び G F P の蛍光観察 )

H E K 2 9 3 細胞を 4 0 0 0 細胞 / w e l l となるように 9 6 w e l l プレートに播種し、 eCMV(-453~-414)-eCMV-80-mito-TurboGFP-SVter 及び CMVp full length-mito-TurboGFP-SVter をそれぞれ 4 0 n g / w e l l となるように導入して、 2 4 時間培養後に蛍光顕微鏡で観察した。結果を図 7 に示す。図中、 G F P は G F P の蛍光観察結果、 M i t o t r a c k e r はミトコンドリアの観察結果、 M a r g e は G F P と M i t o t r a c k e r を合成した結果、 B F ( p h a s e ) は明視野である。また、上段に示す CMVp Full length は CMVp full length-mito-TurboGFP-SVter を導入した場合、下段に示す eCMV453-414-TurboGFP は eCMV(-453~-414)-eCMV-80-mito-TurboGFP-SVter を導入した場合を示す。

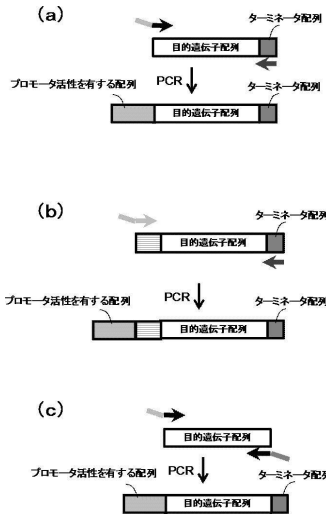
30

【 0 0 5 5 】

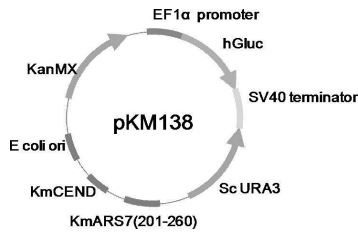
( 結果 )

図 7 に示すように、 eCMV(-453~-414)-eCMV-80-mito-TurboGFP-SVter を導入した細胞では CMVp full length-mito-TurboGFP-SVter を導入した細胞と同様にミトコンドリアにおいて G F P の蛍光が観察された。上記結果から、本発明のフォワードプライマーを用いることで、目的遺伝子配列の上流にプロモータ活性を有する配列を容易に連結することが可能であること、また、本発明のフォワードプライマーを用いて連結した配列は高いプロモータ活性を有することが明らかとなった。

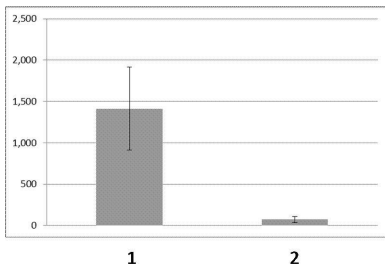
【 図 1 】



【 図 2 】

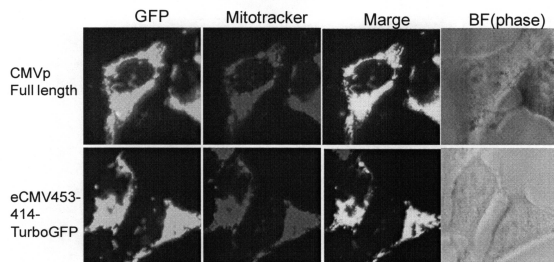


【 図 6 】

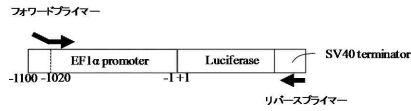


- 1: eCMV(-453~-414)-eCMV(-80~-1)-hgluc-SVter
- 2: eCMV(-80~-1)-hgluc-SVter

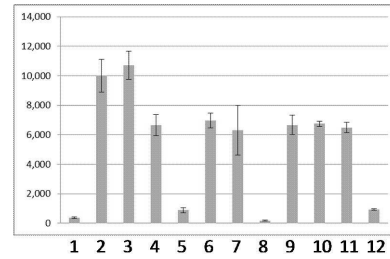
【 図 7 】



【 図 3 】

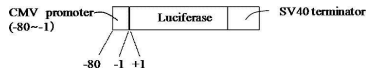


【 図 4 】



- 1: EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 2: EF1α(-1100~-1)-hgluc-SVter
- 3: eCMV(-500~-426)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 4: eCMV(-495~-426)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 5: eCMV(-490~-461)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 6: eCMV(-475~-426)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 7: eCMV(-453~-414)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 8: eCMV(-430~-391)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 9: eCMV(-130~-71)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 10: eCMV(-130~-61)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 11: eCMV(-120~-61)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter
- 12: eCMV(-90~-61)-EF1α(-1020~-1)-hgluc-SVter

【 図 5 】



【配列表】

0006566536000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100177714  
弁理士 藤本 昌平
- (74)代理人 100141391  
弁理士 園元 修一
- (74)代理人 100198074  
弁理士 山村 昭裕
- (72)発明者 中村 美紀子  
山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内
- (72)発明者 赤田 倫治  
山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内
- (72)発明者 星田 尚司  
山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内

審査官 市島 洋介

- (56)参考文献 再公表特許第2005/017144(JP, A1)  
再公表特許第2006/085616(JP, A1)  
国際公開第2014/044845(WO, A1)  
特開2014-094943(JP, A)  
特表2013-517782(JP, A)  
特表2014-506456(JP, A)  
J. Virol., 1990年, Vol.64, No.1, pp.264-277

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS  
(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)