

(43) 国際公開日
2009年1月8日 (08.01.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/004842 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) A61P 39/02 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/055550

(22) 国際出願日: 2008年3月25日 (25.03.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2007-174919 2007年7月3日 (03.07.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 出光興産株式会社 (IDEMITSU KOSAN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008321 東京都千代田区丸の内三丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND

TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒6300192 奈良県生駒市高山町8916-5 Nara (JP). 国立大学法人帯広畜産大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稲田町西2線11番地 Hokkaido (JP).

(71) 出願人 (米国についてのみ): 吉田 まゆみ (YOSHIDA, Mayumi) (発明者(死亡)の相続人) [JP/JP]; 〒6310035 奈良県奈良市学園中5丁目555 エステムコート学園前509号 Nara (JP). 吉田 信男 (YOSHIDA, Nobuo) (発明者(死亡)の相続人) [JP/JP]; 〒6338173 兵庫県西宮市甲子園三番町5-8 Hyogo (JP). 吉田 恭子 (YOSHIDA, Kyoko) (発明者(死亡)の相続人) [JP/JP]; 〒6338173 兵庫県西宮市甲子園三番町5-8 Hyogo (JP).

(72) 発明者: 吉田 和哉 (YOSHIDA, Kazuya) (死亡).

(72) 発明者: および

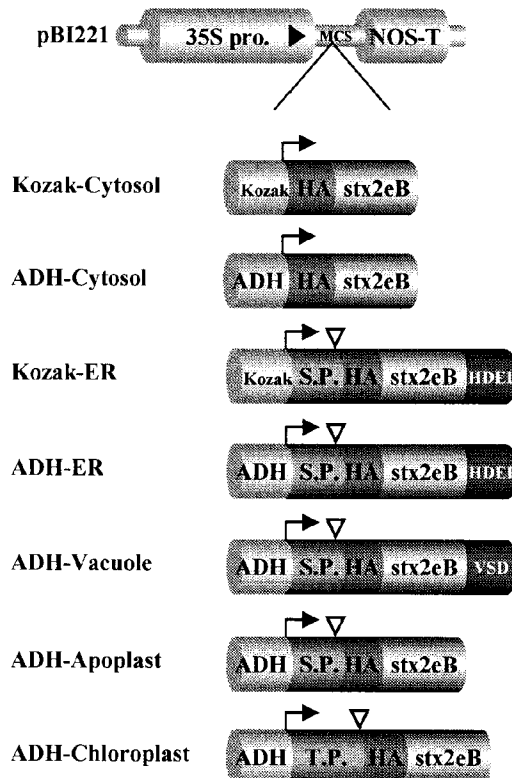
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 澤田 和敏

[続葉有]

(54) Title: VACCINE FOR SWINE EDEMA DISEASE

(54) 発明の名称: ブタ浮腫病ワクチン

[図2]



(57) Abstract: It is intended to develop a technique whereby a vaccine for swine edema disease is produced at a low cost and a high efficiency. More specifically, swine edema disease toxic protein (Stx2e protein) gene is expressed in a plant cell at a high efficiency and thus a plant vaccine for swine edema disease is produced at a low cost. Stx2e protein having a plant-origin secretion signal peptide that has been attached to the amino end thereof is expressed in a plant cell (for example, lettuce) by using the 5'-untranslation region of plant-origin alcohol dehydrogenase gene (ADH5'UTR).

(57) 要約: ブタ浮腫病ワクチンを低コストかつ高効率に生産する技術を開発する。具体的にはブタ浮腫病の毒素タンパク質 (Stx2eタンパク質) の遺伝子を植物細胞で効率良く発現させ、低コストにブタ浮腫病の植物ワクチンを生産する。植物由来の分泌シグナルペプチドがアミノ末端に付加されたStx2eタンパク質を、植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5'-非翻訳領域 (ADH5'UTR) を用いて、レタス等の植物細胞で発現させる。



(SAWADA, Kazutoshi) [JP/JP]; 〒2990293 千葉県袖ヶ浦市上泉 1 2 8 0 番地 Chiba (JP). 松井 健史 (MATSUI, Takeshi) [JP/JP]; 〒6300192 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5 Nara (JP). 牧野 壮一 (MAKINO, Sou-ichi) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稲田町西 2 線 1 1 番地 Hokkaido (JP). 川本 恵子 (KAWAMOTO, Keiko) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稲田町西 2 線 1 1 番地 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 1 0 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,

KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

明 細 書

ブタ浮腫病ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、ブタ浮腫病ワクチンを生産するためのDNA構築物、該DNA構築物により形質転換された形質転換体を含むブタ浮腫病ワクチン、及び該ブタ浮腫病ワクチンを用いてブタ浮腫病を防除する方法に関する。

背景技術

[0002] ブタ浮腫病は、Stx2e毒素を有する大腸菌(浮腫病菌)が上部腸管内で急激に増殖し、毒素が血中に吸収されることにより発症する細菌病であり、離乳後1～2週の子豚に高発生することが知られている。浮腫病菌の感染による致死率は、50～90%と極めて高い。現在、浮腫病の防除には多種の抗生物質が用いられているが、耐性菌出現等の問題もあり、その使用は制限されている。

このような背景において、ブタ浮腫病を効率良く予防する方法を提供すべく、ブタ浮腫病ワクチンに関する研究が行われている。例えば、無毒化した浮腫病菌毒素タンパク質を使用してブタを免疫し、浮腫病菌の感染による致死を防いだ例が報告されている(非特許文献1)。ここでは、無毒化した浮腫病菌毒素タンパク質を組換え大腸菌を用いて生産させ、これをブタに接種している。しかしながら、組換え大腸菌による無毒化した浮腫病菌毒素タンパク質の生産量は十分ではなく、さらにこのようなワクチン接種はタンパク質の直接注射もしくは経鼻スプレーなどにより行う必要があり、人間の労力がかかるなど、ブタ浮腫病ワクチンの実用化の観点からは、低コスト化が図れないという問題があった。

[0003] 一方、近年トランスジェニック技術を用いて植物に有用な物質を生産させる研究も行われている。例えば、大腸菌易熱性毒素(LT)タンパク質のBサブユニットをレタスに生産させた例が報告されている(非特許文献2)。この研究では、コドンを変更したLTタンパク質のBサブユニットの遺伝子を、植物高発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(CaMV35S)と、エンハンサーであるKozak配列を用いて、レタス内で発現させている。その結果、LTタンパク質のBサブユニット

がレタスの総可溶性タンパク質の約2.0質量%蓄積したことが報告されている。しかしながら、この程度のタンパク質の蓄積量では、トランスジェニック植物を利用して細菌病の防除を効率的に行うには不十分であると考えられる。すなわち、目的タンパク質の遺伝子を高発現させ、植物細胞内で目的タンパク質を効率良く生産、蓄積させる必要がある。

[0004] 一方、タバコ由来アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5'ー非翻訳領域(NtADH 5' UTR)の塩基配列は、シロイヌナズナやイネで機能するエンハンサーであることが知られている(特許文献1、非特許文献3)。しかしながら、このNtADH 5' UTRの塩基配列を用いて、細菌毒素タンパク質をコードする遺伝子を発現させた例は報告されていない。

[0005] 非特許文献1: Makino et al., Microbial Pathogenesis, Volume 31, Number 1, July 2001, pp. 1-8(08)

非特許文献2: Kim et al., Protein Expression and Purification, Volume 51, Number 1, Jan 2006, pp. 22-27(06)

特許文献1: 特開2003-79372号公報

非特許文献3: Satoh et al., The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. J. Biosci. Bioeng. (2004) 98,1-8

発明の開示

[0006] 本発明は、ブタ浮腫病ワクチンを低コストかつ高効率に生産する技術を開発することを課題とする。また、具体的にはブタ浮腫病の毒素タンパク質(Stx2eタンパク質)の遺伝子を植物細胞で効率良く発現させ、低コストでブタ浮腫病の植物ワクチンを生産することを課題とする。

[0007] 本発明者らは、植物由来の分泌シグナルペプチドがアミノ末端に付加されたStx2eタンパク質を、植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5'ー非翻訳領域(ADH 5' UTR)を用いて発現させることにより、Stx2eタンパク質をレタス等の植物に効率良く生産させ、植物体に高濃度で蓄積させることができることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の通りである。

[0008] 第一の発明は、植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' -非翻訳領域、及び該領域に発現可能に連結された、アミノ末端に植物由来の分泌シグナルペプチドが付加されたStx2eタンパク質をコードするDNAを含むDNA構築物(以下、「本発明のDNA構築物」ともいう。)である。

前記アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' -非翻訳領域は、タバコ由来であることが好ましい。また、前記分泌シグナルペプチドは、タバコ由来であることが好ましい。また、前記Stx2eタンパク質は、Stx2eタンパク質のBサブユニットであることが好ましい。

[0009] また、前記Stx2eタンパク質のカルボキシル末端には、小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドが付加されていることも好ましく、小胞体残留シグナルペプチドは、カルボキシル末端にKDEL配列又はHDEL配列を含むことが好ましく、液胞移行シグナルペプチドは、タバコ由来であることが好ましい。

[0010] また、本発明のDNA構築物は、配列番号12、23、24、75、77、78、86の何れかで表される塩基配列を有することが好ましい。

[0011] 第二の発明は、本発明のDNA構築物を含む組換えベクター(以下、「本発明の組換えベクター」ともいう。)である。

[0012] 第三の発明は、本発明の組換えベクターで形質転換された形質転換体(以下、「本発明の形質転換体」ともいう。)である。

本発明の形質転換体は、形質転換植物細胞又は形質転換植物であることが好ましい。また、前記植物は、レタスであることが好ましい。

[0013] 第四の発明は、前記形質転換体植物細胞又は形質転換植物から得られる種子(以下、「本発明の種子」ともいう。)である。

[0014] 第五の発明は、本発明の形質転換体を含むブタ浮腫病ワクチン(以下、「本発明のブタ浮腫病ワクチン」ともいう。)である。

[0015] 第六の発明は、本発明のブタ浮腫病ワクチンをブタに投与することを特徴とする、ブタ浮腫病の防除方法(以下、「本発明のブタ浮腫病の防除方法」ともいう。)である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]GFPレポーター発現ベクターの構成を示す図である。図において、→は翻訳開

始点を表し、▽は翻訳後に切断される部位を表す。

[図2]Stx2eB発現ベクターの構成を示す図である。図において、→は翻訳開始点を表し、▽は翻訳後に切断される部位を表す。

[図3]デザインしたmStx2eB 1-4の塩基配列をCLUSTALW (<http://align.genome.jp/>)で比較した図である。

[図4]PCRによるmStx2eBの合成の概念を示す図である。

[図5]PCR産物を1.5%アガロースゲル中で展開し、エチジウムブロマイドで染色後、UV照射にてDNAバンドを確認した結果を示す図である(写真)。

[図6]ダイレクトPCRした溶液を1.5%アガロースゲル中で展開し、エチジウムブロマイドで染色後、UV照射にてDNAバンドを確認した結果を示す図である(写真)。

[図7]Stx2eA発現ベクターの構成を示す図である。図において、→は翻訳開始点を表し、▽は翻訳後に切断される部位を表す。

[図8]レタスプロトプラストにおけるGFPLレポーターの発現の状態を示す図である(写真)。

[図9]各シグナルペプチドを付加したStx2eB発現ベクターを用いた形質転換レタスプロトプラストにおけるStx2eBの蓄積量を示す図である(写真)。

[図10]小胞体残留シグナルペプチドを付加したコドン改変Stx2eB発現ベクターを用いた形質転換レタスプロトプラストにおけるStx2eBの蓄積量を示す図である(写真)。

[図11]小胞体残留シグナルペプチドを付加したコドン改変Stx2eB発現ベクターを用いた形質転換レタスプロトプラストにおけるStx2eBの蓄積量を示す図である(写真)。

[図12]小胞体残留シグナルペプチドを付加したStx2eA発現ベクターを用いた形質転換レタスプロトプラストにおけるStx2eAの蓄積量を示す図である(写真)。

[図13]Stx2eB-GST融合タンパク質のSDS-PAGE解析の結果を示す図である(写真)。
M:マーカー、1:Stx2eB 8M尿素溶液、2:リフォールディングStx2eB-GST溶液(注入サンプル)、3:非結合画分、4:洗浄1回目溶出画分、5:洗浄2回目溶出画分、6:溶出サンプル(結合画分)

[図14]抗VT2抗体を用いたウエスタンブロッティング解析の結果を示す図である(写真)。

[図15]Stx2eB-GST融合タンパク質マウス経鼻投与による抗体価測定の結果を示す図である。

[図16]小胞体残留シグナルペプチドを付加したStx2eB発現ベクターを用いた形質転換タバコBY2培養細胞におけるStx2eBの蓄積量を示す図である(写真)。

[図17]デザインしたmStx2eB 5の塩基配列をCLUSTALW (<http://align.genome.jp/>)で比較した図である。

[図18]小胞体残留シグナルペプチドを付加したコドン改変Stx2eB発現ベクターを用いた形質転換タバコBY2培養細胞におけるStx2eBの蓄積量を示す図である(写真)。

[図19]小胞体残留シグナルペプチドを付加したコドン改変Stx2eB発現ベクターを用いた形質転換タバコBY2培養細胞におけるStx2eBの蓄積量を示す図である(写真)。

[図20]浮腫病菌の強制投与0日目に採取した糞便中のStx特異的IgAの抗体価を示す図である。

[図21]浮腫病菌の強制投与0日目に採取した血液中のStx特異的IgGの抗体価を示す図である。

[図22]浮腫病菌の強制投与3日目に採取した糞便中の浮腫病数を示す図である。

[図23]全期間の飼料要求率を示す図である。

[図24]飼料要求率の推移を示す図である。

[図25]子豚1頭当たりの平均臨床症状スコアの推移を示す図である。

[図26]子豚1頭当たりの全期間の合計臨床症状スコアの平均を示す図である。

[図27]浮腫病ワクチン無投与群の子豚と浮腫病ワクチン投与群の子豚の浮腫病菌投与11日目の写真である。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 本発明のDNA構築物は、植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域、及び該領域に発現可能に連結されたアミノ末端に植物由来の分泌シ

グナルペプチドが付加されたStx2eタンパク質をコードするDNAを含むことを特徴とする。

- [0018] アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域とは、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の転写開始点から、翻訳開始点(ATG、メチオニン)の前までの塩基配列を含む領域をいう。該領域は、翻訳量増大機能を有している。「翻訳量増大機能」とは、構造遺伝子にコードされた情報が、転写後、翻訳されてタンパク質が産生される際に、翻訳により産生されるタンパク質量を増大させる機能をいう。前記領域は、植物に由来すればよいが、好ましくはナス科(Solanaceae)、アブラナ科(Brassicaceae)、キク科(Asteraceae)に属する植物、さらに好ましくはタバコ属(Nicotiana)、シロイヌナズナ属(Arabidopsis)、アキノノゲシ属(Lactuca)等に属する植物、より好ましくはタバコ(Nicotiana tabacum)、シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)、レタス(Lactuca sativa)等に由来する。

前記アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域としては、例えばタバコ(Nicotiana tabacum)由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域の塩基配列である、配列番号1で表される塩基配列からなる領域が特に好ましい。

- [0019] 植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域は、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼを高発現している植物培養細胞のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子から単離することができる(特開2003-79372号公報参照)。また、タバコのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域等、その塩基配列が確定しているものについては、化学合成、又は該領域の5' 及び3' 末端の塩基配列をプライマーとし、ゲノムDNAを鋳型としたPCRなどにより合成することもできる。また、塩基配列が確定している前記領域の一部をプローブとして用いることにより、他の植物のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域を探索し、これを単離することもできる。

- [0020] また、配列番号1の塩基配列で表されるような前記アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域は、翻訳量増大機能を保持している限り、1又は数個の塩基の置換、欠失、挿入又は付加を有していてもよい。前記「数個」としては、好ましくは2～10個、さらに好ましくは2～5個、特に好ましくは2～3個である。

また、前記アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域と好ましくは85%以上、特に好ましくは90%以上の同一性を有し、かつ翻訳量増大機能を保持しているDNAを使用してもよい。

[0021] 前記領域が目的とする翻訳量増大機能を有するか否かについては、例えばタバコ培養細胞においてGUS (β -グルクロニダーゼ) 遺伝子又はルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子としたトランジェントアッセイ、染色体に組み込ませた形質転換細胞であるアッセイ等により確認することができる。

[0022] 前記植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域には、アミノ末端に植物由来の分泌シグナルペプチドが付加されたStx2eタンパク質をコードするDNAが、発現可能に連結されている。ここで、「発現可能」とは、本発明のDNA構築物が適切なプロモーターを含むベクターに挿入され、該ベクターが適切な宿主細胞に導入された場合に、宿主細胞内で前記Stx2eタンパク質が生産されることをいう。また、「連結」とは、2つのDNAが直接結合している場合も、他の塩基配列を介して結合している場合も含む概念である。

[0023] Stx2eタンパク質は、浮腫病菌の毒素タンパク質であり、毒性本体である1つのAサブユニットと腸管粘膜への侵入へ関与する5つのBサブユニットからなる。Aサブユニットは、配列番号2のアミノ酸配列で表され、Bサブユニットは、配列番号3のアミノ酸配列で表される。

本発明のDNA構築物に含まれるStx2eタンパク質をコードするDNAは、Aサブユニット及びBサブユニットの両方を含むStx2eタンパク質をコードするDNAであってもよいし、Aサブユニットのみ又はBサブユニットのみをコードするDNAであってもよい。ただし、AサブユニットをコードするDNAを含む場合には、生産されるAサブユニットが無毒化されるように、DNAの塩基配列を改変して用いることが好ましい。

本発明のDNA構築物においては、Stx2eタンパク質をコードするDNAは、BサブユニットのみをコードするDNAであることが好ましい。

[0024] 本発明のDNA構築物においてコードされるStx2eタンパク質は、ブタに投与して免疫応答を引き起こすことができる限り、Stx2eタンパク質のアミノ酸配列(配列番号2及び／又は配列番号3)における1個又は数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入又

は付加されていてもよい。前記「数個」としては、例えば、Aサブユニットにおいて、好ましくは2～30個、さらに好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個であり、Bサブユニットにおいて、好ましくは2～10個、さらに好ましくは2～5個、より好ましくは2～3個である。

また、Stx2eタンパク質のアミノ酸配列(配列番号2及び／又は配列番号3)と、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の同一性を有し、かつブタに投与して免疫応答を引き起こすことができるタンパク質であってもよい。

[0025] Stx2eタンパク質をコードするDNAは、例えば配列番号4及び／又は配列番号5の塩基配列に基づいて、一般的な遺伝子工学的手法により容易に得ることができる。具体的には、Stx2eタンパク質を生産する浮腫病菌より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから上記塩基配列に基づいて作製したプローブを用いて所望のクローンを選択することにより、Stx2eタンパク質をコードするDNAを得ることができる。また、上記塩基配列を基にした化学合成、上記塩基配列の5'及び3'末端の塩基配列をプライマーとし、ゲノムDNAを鋳型としたPCRなどにより合成することもできる。

[0026] また、本発明のDNA構築物の作製に用いることができる、Stx2eタンパク質をコードするDNAの塩基配列は、該タンパク質を生産させる宿主細胞に応じて、Stx2eタンパク質の翻訳量が増大するように、Stx2eタンパク質を構成するアミノ酸残基を示すコドンに適宜改変することも好ましい。

コドン改変の方法としては、例えばKang et al. (2004)の方法を参考にすることができる(実施例に詳述する。)。また、宿主細胞において使用頻度の高いコドンを選択したり、GC含量が高いコドンを選択したり、宿主細胞のハウスキーピング遺伝子において使用頻度の高いコドンを選択したりする方法が挙げられる。

例えば、配列番号5で表される塩基配列をコドン改変した塩基配列としては、配列番号6～9、79で表される塩基配列が挙げられる。本発明のDNA構築物の作製においては、配列番号6、8、9、79で表される塩基配列を有するDNAを用いることが好ましい。

[0027] また、配列番号4及び／又は配列番号5～9の何れかの塩基配列を有するDNAを

有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを使用してもよい。「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、同一性が高い二つのDNAどうし、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の同一性を有する2つのDNAがハイブリダイズするが、それより同一性の低い2つのDNAがハイブリダイズしない条件が挙げられる。例えば2×SSC(330mM NaCl、30mM クエン酸)、42°Cが挙げられる。

[0028] 前記Stx2eタンパク質をコードするDNAは、Stx2eタンパク質のアミノ末端に植物由来の分泌シグナルペプチドが付加されるように、植物由来の分泌シグナルペプチドをコードするDNAと連結される。ここで「付加」とは、前記分泌シグナルペプチドがStx2eタンパク質のアミノ末端に、直接結合している場合も、他のペプチドを介して結合している場合も含む概念である。また、Stx2eタンパク質をコードするDNAがAサブユニット及びBサブユニットの両方を含むStx2eタンパク質をコードする場合において、Aサブユニット及びBサブユニットを融合タンパク質として発現させる場合には、Stx2eタンパク質をコードするDNAは、融合タンパク質のアミノ末端に前記分泌シグナルペプチドが付加されるように、前記分泌シグナルペプチドをコードするDNAと連結されていればよく、Aサブユニット及びBサブユニットを別々に発現させる場合には、Stx2eタンパク質をコードするDNAは、Aサブユニット及びBサブユニットの両方のアミノ末端に前記分泌シグナルペプチドが付加されるように、前記分泌シグナルペプチドをコードするDNAと連結されていればよい。

分泌シグナルペプチドは、好ましくはナス科(Solanaceae)、アブラナ科(Brassicaceae)、キク科(Asteraceae)に属する植物、さらに好ましくはタバコ属(Nicotiana)、シロイヌナズナ属(Arabidopsis)、アキノノゲシ属(Lactuca)等に属する植物、より好ましくはタバコ(Nicotiana tabacum)、シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)、レタス(Lactuca sativa)等に由来する。

また、好ましくはタバコの β -Dグルカンエキソヒドラーゼ(β -D-gulucan exohydrolase)、タバコの38kDa ペルオキシダーゼ(GenBank Accession D42064)に由来する。

前記分泌シグナルペプチドとしては、例えば、タバコの β -Dグルカンエキソヒド

ラーゼに由来する、配列番号10で表されるアミノ酸配列を有しているものが挙げられる。また、該分泌シグナルペプチドをコードするDNAの塩基配列は、例えば配列番号11で表される。

[0029] 前記分泌シグナルペプチドをコードするDNAは、種々の植物から探索、単離することもできるし、前記配列番号11の塩基配列に基づいてプローブを作製し、種々の植物のcDNAから得ることもできるし、同塩基配列に基づいて、化学合成やPCR等の手法により得ることもできる。

[0030] 本発明のDNA構築物としては、配列番号1の塩基配列からなるDNA、配列番号11の塩基配列からなるDNA、及び配列番号5～9の何れかの塩基配列からなるDNAが連結したDNA構築物が好ましく挙げられる。このような本発明のDNA構築物としては、例えば配列番号12の塩基配列を有するDNA構築物が挙げられる。

[0031] さらに、前記Stx2eタンパク質をコードするDNAは、Stx2eタンパク質のカルボキシル末端に小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドが付加されるように、小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドをコードするDNAと連結されることが好ましい。ここで「付加」とは、前記小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドが、Stx2eタンパク質のカルボキシル末端に直接結合している場合も、他のペプチドを介して結合している場合も含む概念である。また、Stx2eタンパク質をコードするDNAがAサブユニット及びBサブユニットの両方を含むStx2eタンパク質をコードする場合において、Aサブユニット及びBサブユニットを融合タンパク質として発現させる場合には、Stx2eタンパク質をコードするDNAは、融合タンパク質のカルボキシル末端に前記分泌シグナルペプチドが付加されるように、前記小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドをコードするDNAと連結されていればよく、Aサブユニット及びBサブユニットを別々に発現させる場合には、Stx2eタンパク質をコードするDNAは、前記小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドが、Aサブユニット及びBサブユニットの少なくとも一つのカルボキシル末端に付加されるように、前記小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドをコードするDNAと連結されていればよい。

[0032] 小胞体残留シグナルペプチドとしてはKDEL配列(配列番号13)、HDEL配列(配

列番号14)、KDEF配列(配列番号15)又はHDEF配列(配列番号16)を含む小胞体残留シグナルペプチドが挙げられる。例えば、HDEL配列を含む小胞体残留シグナルペプチドとしては配列番号17のアミノ酸配列で表される小胞体残留シグナルペプチド等が好ましく用いられる。なお、この小胞体残留シグナルペプチドをコードするDNAの塩基配列は、例えば配列番号18で表される。

[0033] 液胞移行シグナルペプチドとしては、好ましくはナス科(Solanaceae)科、アブラナ科(Brassicaceae)、キク科(Asteraceae)に属する植物、さらに好ましくはタバコ(Nicotiana)属、シロイヌナズナ属(Arabidopsis)、セイヨウワサビ属(Armoracia)等に属する植物、より好ましくはタバコ(Nicotiana tabacum)、シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)、セイヨウワサビ(Armoracia rusticana)等に由来する。また、好ましくは、キチナーゼに由来する。タバコキチナーゼ由来の液胞移行シグナルペプチドのアミノ酸配列は、配列番号19で表される。また、タバコキチナーゼ由来の液胞移行シグナルペプチドをコードするDNAの塩基配列は、例えば配列番号20で表される。

また、好ましくは、セイヨウワサビペルオキシダーゼC1a アイソザイムに由来する。セイヨウワサビペルオキシダーゼC1a アイソザイム由来の液胞移行シグナルペプチドのアミノ酸配列は、配列番号21で表される。また、セイヨウワサビペルオキシダーゼC1a アイソザイム由来の液胞移行シグナルペプチドをコードするDNAの塩基配列は、例えば配列番号22で表される。

[0034] 本発明のDNA構築物としては、配列番号1の塩基配列からなるDNA、配列番号11の塩基配列からなるDNA、配列番号5～9の何れかの塩基配列からなるDNA、並びに配列番号18又は配列番号20の塩基配列からなるDNAが連結した、植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' -非翻訳領域、及びアミノ末端に植物由来の分泌シグナルペプチドが、カルボキシル末端に小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドが付加されたStx2eタンパク質をコードするDNAからなるDNA構築物が好ましく挙げられる。小胞体残留シグナルペプチドが付加された本発明のDNA構築物としては、例えば配列番号23、75、77、78、86の何れかの塩基配列を有するDNA構築物が挙げられる。液胞移行シグナルペプチドが付加された本発明のDNA構築物としては、例えば配列番号24で表されるDNA構築物が

挙げられる。

- [0035] 本発明のDNA構築物は、一般的な遺伝子工学的手法により作製することができ、植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5' - 非翻訳領域、植物由来の分泌シグナルペプチドをコードするDNA、及びStx2eタンパク質をコードするDNA、任意で小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドをコードするDNAを含むDNAを、それぞれ、適当な制限酵素により切断し、適当なりガーゼで連結することにより行うことができる。
- [0036] 本発明の組換えベクターは、本発明のDNA構築物を含むことを特徴とする。本発明の組換えベクターは、N末端に植物由来の分泌シグナルペプチドが付加されたStx2eタンパク質をコードするDNAが、ベクターが導入される宿主細胞において発現可能なように、ベクター内に挿入されていればよい。ベクターは、宿主細胞において複製可能なものであれば特に制限されず、例えば、プラスミドDNA、ウィルスDNA等が挙げられる。また、ベクターは薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーを含むことが好ましい。プラスミドDNAは、大腸菌やアグロバクテリウムからアルカリ抽出法 (Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) *Nucleic acid Res* 7: 1513) 又はその変法等により調製することができる。また、市販のプラスミドとして、例えばpBI221、pBI121、pBI101、pIG121Hm等を用いることもできる。ウィルスDNAとしては、例えばpTB2 (Donson et al., 1991) 等を用いることができる (Donson J., Kerney CM., Hilf ME., Dawson WO. *Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1991) 88: 7204-7208を参照。)
- [0037] ベクター内で用いられるプロモーターは、ベクターが導入される宿主細胞に応じて適宜選択することができる。例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (O'dell et al. 1985 *Nature* 313:810)、イネのアクチンプロモーター (Zhang et al. 1991 *Plant Cell* 3:1155)、トウモロコシのユビキチンプロモーター (Cornejo et al. 1993 *Plant Mol. Biol.* 23:567) 等が好ましく用いられる。また、ベクター内で用いられるターミネーターも、同様にベクターが導入される宿主細胞に応じて適宜選択することができる。例えば、ノパリン合成酵素遺伝子転写ターミネーター、カリフラワーモザイクウイルス35Sターミネーター等が好ましく用いられる。

[0038] 本発明の組換えベクターは、例えば以下のようにして作製することができる。

まず、本発明のDNA構築物を適当な制限酵素で切断又はPCRによって制限酵素部位を付加し、ベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入する。

[0039] 本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターで形質転換されていることを特徴とする。形質転換に用いられる宿主細胞は真核細胞及び原核細胞の何れでもよい。

真核細胞としては、植物細胞が好ましく用いられ、中でもキク(Asteraceae)科、ナス科、アブラナ科、アカザ科に属する植物の細胞が好ましく用いられる。さらに、アキノノゲシ(Lactuca)属に属する植物の細胞、中でもレタス(Lactuca sativa)細胞が好ましく用いられる。宿主細胞としてレタス細胞を用いる場合は、ベクターは、カリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター等を用いることができる。

原核細胞としては、大腸菌(Escherichia coli)、アグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens)等が用いられる。

[0040] 本発明の形質転換体は、一般的な遺伝子工学的手法を用いて、本発明のベクターを宿主細胞に導入することにより作製することができる。例えば、アグロバクテリウムを利用した導入方法(Hood, et al., 1993, Transgenic, Res. 2:218, Hiei, et al., 1994 Plant J. 6:271)、エレクトロポレーション法(Tada, et al., 1990, Theor. Appl. Genet, 80:475)、ポリエチレングリコール法(Lazzeri, et al., 1991, Theor. Appl. Genet. 81:437)、パーティクルガン法(Sanford, et al., 1987, J. Part. Sci. tech. 5:27)、ポリカチオン法(Ohtsuki)などの方法を用いることが可能である。

本発明のベクターを宿主細胞に導入した後、選択マーカーの表現型によって本発明の形質転換体を選抜することができる。また、選抜した形質転換体を培養することにより前記Stx2eタンパク質を生産することができる。培養に用いる培地及び条件は、形質転換体の種に応じて適宜選択することができる。

また、宿主細胞が植物細胞の場合には、選抜した植物細胞を常法に従って培養することにより、植物体を再生することができ、植物細胞内又は植物細胞の細胞膜外に前記Stx2eタンパク質を蓄積させることができる。例えば、植物細胞の種類により異なるが、ジャガイモであればVisserら(Theor. Appl. Genet 78:594(1989))の方法が

挙げられ、タバコであればNagataとTakebe (Planta 99: 12 (1971))の方法が挙げられる。

[0041] レタスの場合は0.1 mg /lのNAA(ナフタレン酢酸)、0.05 mg/lのBA(ベンジルアデニン)および0.5 g/lのpolyvinylpyrrolidoneを含むMS培地でシュートの再生が可能であり、再生したシュートを0.5 g/lのpolyvinylpyrrolidoneを含む1/2 MS培地で培養することで発根が可能である。

[0042] また、本発明の種子は、上記のようにして再生した植物体から種子を採取することにより得ることができる。本発明の種子は適当な方法で播種し栽培することにより、Stx2eタンパク質を生産する植物体とすることができ、このような植物体も、本発明の形質転換体に含まれる。

[0043] 本発明のブタ浮腫病ワクチンは、本発明の形質転換体を含むことを特徴とする。本発明のブタ浮腫病ワクチンは、Stx2eタンパク質を含む本発明の形質転換体の全部を含んでいても、一部を含んでいてもよい。また、形質転換体をそのまま用いることもでき、乾燥、粉碎するなどして用いることもできる。また、本発明のブタ浮腫病ワクチンには、Stx2eタンパク質の免疫原性を高めるアジュバントを配合することもできる。一般的には、安全性を考慮して水酸化アルミニウムなどがアジュバントとして用いられる。一方、Stx2eタンパク質のBサブユニットは、それ自体がアジュバント活性を示すため、本発明のDNA構築物がBサブユニットをコードするDNAを含む場合には、さらにアジュバントを配合しなくても、高い免疫原性が得られる。

[0044] 本発明のブタ浮腫病の防除方法は、本発明のブタ浮腫病ワクチンをブタに投与することを特徴とする。本発明のブタ浮腫病ワクチンによる免疫は、浮腫病の発生率が高い子豚に対して行うことが好ましい。免疫の方法としては、本発明のブタ浮腫病ワクチンを母豚に投与して、母豚が産生した抗体を、乳汁により子豚に与える方法、本発明ブタ浮腫病ワクチンを子豚に投与し、子豚を直接免疫する方法等が挙げられる。

本発明のブタ浮腫病ワクチンをブタに投与する方法としては、ブタの飼料に本発明のブタ浮腫病ワクチンを混合してブタに与える方法、ブタに点鼻する方法などが挙げられる。この場合の投与量は、Stx2eタンパク質の質量として、1日当たり好ましくは4

mg以上、さらに好ましくは16mg以上である。ブタ浮腫病ワクチンは、一定の間隔において、複数回投与することが好ましい。例えば、4～7日おきに、合計2～3回投与する方法が挙げられる。

実施例

[0045] (1) GFP発現ベクターの構築

レタス細胞におけるタンパク質の局在化制御について検討するために、各シグナルペプチドが付加された緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするDNAを含む発現ベクターを以下のようにして作製した(図1)。

タバコアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5'非翻訳領域(NtADH 5' UTR、配列番号1)を、ADH-221(Sato et. al., 2004)を鋳型として、ADH XbaI-F プライマー(配列番号25)及びADH NsiI-R プライマー(配列番号26)を用いたPCRにより増幅した。 β -D glucan exohydrolase(GenBank ACCESSION AB017502)のシグナルペプチド(配列番号11)をコードするDNA領域を、タバコゲノムDNAを鋳型にして、 β D NsiI-F プライマー(配列番号27)および β D EcoRI-R プライマー(配列番号28)を用いて増幅した。得られたNtADH 5'UTR およびシグナルペプチドの各DNA断片をNsiI (TOYOBO社製)で処理し、ligation high (TOYOBO社)を用いてライゲーションした後、末端を平滑化してpBluescript II SK (Stratagene社製)のEcoRV ギャップにクローニングした(plasmid 1)。

[0046] Plasmid 1をNsiI で処理し、T4 DNA polymerase (TOYOBO社製)で末端を平滑化した後セルフライゲーションして、NtADH の開始コドン(atg)と β -D glucan exohydrolase の開始コドンが一致するように融合した(plasmid 2)。液胞輸送シグナル(配列番号19)をC 末端に有するGFP (pSGFP5T, Di Sansebastiano et al., 1998)をコードするDNAを、EcoRI サイトを介してplasmid 2に挿入した(液胞型GFP)。

[0047] pSGFP5Tを鋳型として、GFP-F プライマー(配列番号29)およびGFP-Rプライマー(配列番号30)を用いてPCRを行った。得られたDNA断片の末端を平滑化したのち、pBluescript II SKのEcoRVギャップにクローニングした(plasmid 3)。Plasmid 3から、EcoRIとXhoIを用いてGFP断片を切り出し、plasmid 2のEcoRI-XhoIギャップに挿入した(アポプラスト型GFP)。

- [0048] Plasmid 3から、NsiIとXhoI を用いてGFP 断片を切り出し、plasmid 1のNsiI-EcoRI ギャップに挿入した(細胞質型GFP)。
- [0049] pSGFP5を鋳型として、GFP-F プライマーおよびGFP HDEL-R プライマー(配列番号31)を用いてPCR を行った。得られたDNA 断片の末端を平滑化したのち、pBluescript II SKのEcoRV ギャップにクローニングした(plasmid 4)。Plasmid 4からEcoRI とXhoI を用いてGFP断片を切り出し、plasmid 2のEcoRI-XhoI ギャップに挿入した(小胞体型GFP)。
- [0050] レタスRbcs(ルビスコスモールサブユニット)(GenBank ACCESSION D14001)由来葉緑体移行シグナルペプチド(トランジットペプチド、T.P.、配列番号45)をコードするDNA 断片を、レタス葉cDNA を鋳型として、TP NsiI-F プライマー (配列番号32)およびTP EcoRI-R プライマー (配列番号33)を用いてPCRにより増幅した。得られた断片をNsiIとEcoRIで処理し、plasmid 1のNsiI-EcoRI ギャップに連結した(plasmid 5)。Plasmid 5をNsiI で処理し、T4 DNA polymerase (TOYOBO社製)で末端を平滑化した後セルフライゲーションして、NtADHの開始コドンとRbcsの開始コドンが一致するように融合した(plasmid 6)。Plasmid 3から、EcoRI とXhoI を用いてGFP断片を切り出し、plasmid 6のEcoRI-XhoI ギャップに挿入した(葉緑体型GFP)。

なお、これらのGFP発現ベクターの構築に際しては、下記文献を参照することができる。

Di Sansebastiano et. al., Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J.* (1998) 15, 449-457

Satoh et al., The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. *J. Biosci. Bioeng.* (2004) 98,1-8

- [0051] 上記各局在型GFPを、以下のようにして植物細胞における一過性発現用ベクター、pBI221(Clontech 社)のマルチクローニングサイト(MCS)に挿入した。

MCSにSalI、KpnI及びSmaIサイトを導入するために、SalKpnSma-F(配列番号34)とSalKpnSma-R (配列番号35)をアニーリング後、T4 polynucleotide kinase (T4 PNK

(TaKaRa 社)を用いてリン酸化し、pBI221 のSacI ギャップに挿入した(plasmid 7)。各局在型GFPをXbaI とKpnIを用いて、plasmid 7に挿入し、カリフラワーモザイクウイルス 35S RNA プロモーター (35S pro.)とパリン合成酵素遺伝子転写ターミネーター (NO S-T)の間に配置し、GFP発現ベクターを作製した。

[0052] (2) Stx2eB発現ベクターの構築

各シグナルペプチドが付加された、Stx2eタンパク質のBサブユニット(Stx2eB)をコードするDNA (配列番号5)を含む本発明のDNA構築物を含むベクターを、以下のようにして作製した。

[0053] Kozak-stx2eb-Fプライマー(配列番号36)とstx2eb-R プライマー(配列番号37)を用いてPCRを行い、Stx2eBの成熟領域(ペリプラズムへの分泌シグナルペプチドを除く、Ala19～Asn87)をコードするDNA断片を増幅した。得られたDNA断片をpBlue script II SKのEcoRV ギャップにクローニングした。得られたプラスミドをHindIII で切断し、T4 DNA polymerase で処理した後セルフライゲーションを行い、HindIII サイトをNheI サイトに変換した(plasmid 8)。

Plasmid 8 からXbaI とKpnI でKozak-Stx2eB 断片を切り出し、plasmid 7 のXbaI-KpnI ギャップに挿入し、Kozak連結細胞質型Stx2eB発現ベクター (Kozak-Cytosol-Stx2eB)を作製した(plasmid 9)。

[0054] NtADH 5'UTR 断片を、ADH XbaI-FとADH BamHI-Rプライマー (配列番号38)を用いて増幅した。得られたDNA 断片を、XbaI とBamHI で処理し、plasmid 9のXbaI-BamHI ギャップに挿入し、NtADH 5'-UTR連結細胞質型Stx2eB発現ベクター (ADH-Cytosol-Stx2eB)を作製した(plasmid 10)。

[0055] 分泌シグナルペプチドの増幅のために、plasmid 2 を鋳型として、 β D-Kozak-F プライマー(配列番号39)と β D BamHI-R プライマー(配列番号40)を用いてPCRを行った。得られたDNA 断片をXbaI およびBamHI で処理し、plasmid 9のXbaI-BamHI ギャップに挿入した(plasmid 11)(Kozak-Apoplast-Stx2eB)。

[0056] 小胞体残留シグナル付加のために、HDEL-Fプライマー(配列番号41)とHDEL-R プライマー(配列番号42)をアニーリングしてT4 PNK でリン酸化し、アルカリフォスファターゼ(AP)(TaKaRa社)で脱リン酸化処理したplasmid 11のBglIIギャップに挿入し、Ko

zak連結小胞体型Stx2eB発現ベクター (Kozak-ER-Stx2eB) を作製した(plasmid 12)。

[0057] NtADH 5'UTRと分泌シグナルペプチドが融合したDNA 断片を作製するために、plasmid 2を鋳型として用い、ADH XbaI-F プライマーと β D BamHI-R プライマーを用いてPCRを行った。得られたDNA断片をXbaI およびBamHI で処理し、plasmid 9 のXbaI-BamHIギャップに挿入し、NtADH 5'連結アポプラスト型Stx2eB発現ベクター (ADH-Apoplast-Stx2eB) を作製した(plasmid 13)。

[0058] 小胞体残留シグナル付加のために、HDEL-F プライマーとHDEL-R プライマーをアニーリングしてT4 PNK でリン酸化し、APで脱リン酸化処理したplasmid 13 のBglII ギャップに挿入し、NtADH 5'-UTR連結小胞体型Stx2eB発現ベクター (ADH-ER-Stx2eB) を作製した(plasmid 14)。

[0059] 液胞輸送シグナル付加のために、VSD-F プライマー(配列番号43)とVSD-R プライマー(配列番号44)をアニーリングしてT4 PNK でリン酸化し、APで脱リン酸化処理したplasmid 13 のBglII ギャップに挿入し、NtADH 5'-UTR連結液胞型Stx2eB発現ベクター (ADH-Vacuole-Stx2eB) を作製した(plasmid 15)。

[0060] 葉緑体移行シグナルペプチド(配列番号45)の付加のために、plasmid 6 を鋳型にして、ADH XbaI-F プライマーとTP BamHI-R プライマー(配列番号46)を用いてPCRを行った。得られたDNA断片をXbaI およびBamHI で処理し、plasmid 9 のXbaI-BamHI ギャップに挿入し、NtADH 5'-UTR連結葉緑体型Stx2eB発現ベクター (ADH-Chloroplast Stx2eB) を作製した(plasmid 16)。

[0061] なお、Stx2eB検出用のペプチドタグとして、HAタグを融合した。HA タグの付加のために、HA-F プライマー(配列番号47)とHA-R プライマー(配列番号48) をアニーリングしてT4 PNK でリン酸化した。得られたリン酸化HA断片を、plasmid 9, 10, 12, 13, 14, 15 および16 のBamHI ギャップへ挿入し、Kozak-Cytosol-Stx2eB、ADH-Cytosol-Stx2eB、Kozak-ER-Stx2eB、ADH-Apoplast-Stx2eB、ADH-ER-Stx2eB、ADH-Vacuole-Stx2eB、ADH-Chloroplast-Stx2eB の各Stx2eB 発現ベクターを作製し、以下の発現試験に用いた(図2)。

[0062] (3)コドン改変Stx2eB発現ベクターの構築

配列番号5で表されるStx2eBをコードするDNAの塩基配列のコドンを変更し、Nt

ADH 5'UTRが付加された、小胞体型コドン改変Stx2eBを以下の方法により作製した。

[0063] (a)コドン改変Stx2eBのデザイン

コドン改変Stx2eBとして1)Kang et al.(2004)の方法に基づく配列、2)レタスにおいて使用頻度の高いコドンを選択した配列、3)GC含量が高いコドンのうち、レタスにおいて使用頻度の高いコドンを選択した配列、4)ハウスキーピング遺伝子(アクチン遺伝子、 β -チューブリン遺伝子)において使用頻度の高いコドンを選択した配列の4種をデザインした。

[0064] 1)Kang et al. (2004)の方法に基づく配列

この文献に示してある改変前後のLTB遺伝子配列とタバコのコドン使用頻度表を基に、コドンの改変フローチャートを作成し、このフローチャート及びレタスのコドン使用頻度表を基に、Stx2eBのコドン改変を行った。作製したコドン改変Stx2eBをmStx2eB1とした(配列番号6)。レタスのコドン使用頻度表は、かずさDNA研究所のデータベース(<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>) 上にあるレタスのCodon usageを利用した(以下同じ)。

[0065] 2)レタスにおいて使用頻度の高いコドンを選択した配列

レタスのコドン使用頻度表を基に、使用頻度が最も高いコドンだけを使用して、コドン改変を行った。例えば、Alaのコドンの中では使用頻度が最も高いコドンはGCAであるため、Stx2eB中のAlaのコドンは全てGCAに統一した。作成したコドン改変Stx2eBをmStx2eB2とした(配列番号7)。

[0066] 3)GC含量が高いコドンのうち、レタスにおいて使用頻度の高いコドンを選択した配列

レタスのコドン使用頻度表を基に、GC含量が多く、かつ使用頻度の高いコドンを選択してコドン改変を行った。例えば、AlaのコドンではGC含量が最も高いコドンはGCCとGCGであり、さらに使用頻度の高いコドンはGCCであることから、Stx2eB中のAlaは全てGCCに変換した。作成したコドン改変Stx2eBをmStx2eB3とした(配列番号8)。

[0067] 4)ハウスキーピング遺伝子(アクチン遺伝子、 β -チューブリン遺伝子)において使用頻度の高いコドンを選択した配列

レタスのハウスキーピング遺伝子において高い頻度で使用するコドンを選択し、コドン改変を行った。ハウスキーピング遺伝子としてactin、 β -tubulin1, 2, 3を選択した。両遺伝子の塩基配列は、NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を使用した。両遺伝子で使用されているコドンおよびコドン使用頻度を表1及び表2にまとめた。この中から最も使用頻度が高いコドンを選択しコドン改変を行った。作成したコドン改変Stx2eBをmStx2eB4とした(配列番号9)。

[0068] [表1]

Amino acid	Triplet	Codon usage	Actin	β -tubulin			Optimization
				1	2	3	
Ala	GCA	0.35	3	4	3	5	GCC
	GCC	0.20	3	7	5	6	
	GCG	0.11	1	1	1	0	
	GCT	0.34	5	4	7	4	
Arg	AGA	0.39	4	1	3	4	CGT
	AGG	0.22	1	6	3	4	
	CGA	0.13	0	1	1	0	
	CGC	0.06	0	3	0	2	
	CGG	0.07	0	0	1	0	
	CGT	0.14	3	4	7	5	
Asn	AAC	0.46	3	8	8	7	AAC
	AAT	0.54	2	6	6	7	
Asp	GAC	0.31	1	5	7	4	GAT
	GAT	0.69	5	7	5	8	
Cys	TGC	0.42	0	5	4	5	TGC
	TGT	0.58	0	4	5	4	
Gln	CAA	0.71	2	7	9	9	CAA
	CAG	0.29	2	5	3	3	
Gly	GGA	0.33	2	7	4	7	GGT
	GGC	0.14	1	3	0	1	
	GGG	0.20	1	4	6	4	
	GGT	0.34	5	4	8	6	
His	CAG	0.36	3	2	3	1	CAT
	CAT	0.64	2	4	3	5	
Ile	ATA	0.27	0	0	0	1	ATC
	ATC	0.30	2	5	6	6	
	ATT	0.44	5	5	4	3	
Leu	CTA	0.12	0	4	7	2	CTC
	CTC	0.14	4	9	8	8	
	CTG	0.08	0	2	3	3	
	CTT	0.26	3	4	4	6	
	TTA	0.16	1	2	2	1	
	TTG	0.25	0	4	1	4	
Lys	AAA	0.52	2	5	4	7	AAG
	AAG	0.48	3	7	8	5	
Met	ATG	1.00	6	16	16	16	ATG
Phe	TTC	0.49	2	8	7	10	TTC
	TTT	0.51	3	8	9	6	

[0069] [表2]

Amino acid	Codon usage	Triplet	Actin	β -tublin			Optimization
				1	2	3	
Pro	CCA	0.39	3	6	8	5	CCA
	CCC	0.16	1	3	2	3	
	CCG	0.11	0	0	0	2	
	CCT	0.34	5	5	4	4	
Ser	AGC	0.12	1	2	2	2	TCC
	AGT	0.18	2	1	1	1	
	TCA	0.22	0	3	8	4	
	TCC	0.16	2	8	2	8	
	TCG	0.08	0	2	0	1	
	TCT	0.24	0	6	9	7	
Thr	ACA	0.37	1	7	5	6	ACT
	ACC	0.26	2	5	6	6	
	ACG	0.10	0	1	0	0	
	ACT	0.27	4	8	10	8	
	ACW	-	-	-	-	1	
Trp	TGG	1.00	2	3	3	3	TGG
Tyr	TAC	0.44	1	6	5	7	TAC
	TAT	0.56	4	2	3	1	
Val	GTA	0.16	1	1	0	1	GTT
	GTC	0.17	0	5	8	6	
	GTG	0.28	4	5	5	4	
	GTT	0.39	6	7	5	7	
X	CYC	-	-	-	-	1	

[0070] デザインしたmStx2eB 1-4の塩基配列をCLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) で比較した(図3)。

コドン改変前後のStx2eBの配列XXG/C (Xは任意の塩基) 比とGC比を表3に示した。mStx2eB2以外のXXG/C比はStx2eBよりも高く、mStx2eB3では100%であった。GC比も同様にmStx2eB2以外でStx2eBよりも高く、最も高かったのはmStx2eB3の61.4%であった。

[0071] [表3]

	XXG / C (%)	GC (%)
Stx2eB	47.1	42.4
mStx2eB1	67.1	49.0
mStx2eB2	5.7	30
mStx2eB3	100	61.4
mStx2eB4	60	49.0

[0072] (b)コドン改変Stx2eBの作製

mStx2eB 1-4の塩基配列をもとに、それぞれ6種類の塩基配列を有するプライマーを作製した。

[0073] 1) Kang et al.(2004)の方法に基づく配列

A:配列番号49

B:配列番号50

C:配列番号51

D:配列番号52

E:配列番号53

F:配列番号54

[0074] 2) レタスにおいて使用頻度の高いコドンを選択した配列

A:配列番号55

B:配列番号56

C:配列番号57

D:配列番号58

E:配列番号59

F:配列番号60

[0075] 3) GC含量が高いコドンのうち、レタスにおいて使用頻度の高いコドンを選択した配列

A:配列番号61

B:配列番号62

C:配列番号63

D:配列番号64

E:配列番号65

F:配列番号66

[0076] 4) ハウスキーピング遺伝子において使用頻度の高いコドンを選択した配列

A:配列番号67

B:配列番号68

C:配列番号69

D:配列番号70

E:配列番号71

F:配列番号72

[0077] 上記で合成したオリゴマーを使用し、Kang et al.(2004)の方法に基づき以下の条件で1st PCR反応を行い、4種類のコドン改変Stx2eBを合成した。すなわち、プライマーAとB、CとD、EとFの組み合わせでPCRを行い、それぞれ87bp (A+B)、78bp (C+D)、69bp (E+F)の遺伝子断片を合成した。次にA+BとC+Dの組み合わせで2nd PCRを行い、153bp (A+B+C+D)の遺伝子断片を合成した。最後にA+B+C+DとE+Fの組み合わせで3rd PCRを行い、最終的に210bpの遺伝子を合成した(図4参照)。反応条件は最終容量が25 μ lとなるよう、10 pmol オリゴヌクレオチド、0.2mM dNTP、pfu DNA polymerase buffer、0.3U pfu DNA polymeraseを添加し、94°C、5分間加熱した後、94°C、1分間、56°Cまたは60°C、1分間、72°C、1分間の加熱処理を25または30サイクル行い、最後に72°Cで5分間加熱した。2nd PCR、3rd PCRには、1st PCR、2nd PCR後の反応液1 μ lをテンプレートとして使用した。1st PCRと2nd PCRでは目的のDNAが増幅したが、3rd PCRでは目的の大きさのDNAが増幅しなかった。しかし、3rd PCR産物をテンプレートにしてEx TaqによるPCRを行ったところ、210bp付近に増幅産物を認めた(図5)。増幅産物をTAクローニングした後、ダイレクトPCRでインサートの有無を確認し(図6)、インサートを確認したものにつき、シーケンシングにより配列を確かめた。その結果目的とするmStx2eB1-4が得られたことを確認した。

[0078] (c)コドン改変Stx2eB発現ベクターの構築

コドン改変Stx2eB1-4の翻訳量を評価するための一過性発現ベクターを構築した。上述したカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、タバコ由来アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子5'非翻訳領域、シグナルペプチド、小胞体残留シグナル及びH Aタグを付加したベクターpBI221を制限酵素で切断後、目的のDNA断片をDNA Ligation Kit (Mighty Mix) (TaKaRa)でつなぎ、NtADH5'UTRが付加された、小胞体型コドン改変Stx2eB発現ベクター(ADH-ER-mStx2eB1-4)を作製した。

[0079] (4)Stx2eA発現ベクターの構築

小胞体移行シグナルペプチドが付加された、Stx2eタンパク質のAサブユニットの成熟領域(ペリプラズムへの分泌シグナルペプチド領域を除く、Gln23~Glu319)(Stx2eA)をコードするDNA(配列番号4)を以下の方法により作製した。

Stx2eA BamHI-F プライマー(配列番号73)とStx2eA BglII-R プライマー(配列番号

74)を用いてPCRを行った。得られたDNA断片をBamHIとBglIIIで処理した後、上述したKozak-ER-Stx2eB及びADH-ER-Stx2eBの発現ベクターのBamHI-BglIIIギャップにそれぞれ挿入し、Kozak-ER-Stx2eA又はADH-ER-Stx2eAを作製した(図7)。

[0080] (5)レタスプロトプラストを用いた一過性発現実験

鉢植えしたレタス(*Lactuca sativa*) (グリーンウェーブ)の葉、約1gをメスで0.5cm四方程度に切り刻んでリーフディスクを作製した。リーフディスクを500mMマンニトールに浸漬し、1時間振盪した。リーフディスクを50mlのプロトプラスト化酵素溶液(1.0% cellulose RS (ヤクルト本社), 0.25% macerozyme R-10 (ヤクルト本社), 400mM マンニトール, 8mM CaCl_2 , and 5mM Mes-KOH, pH 5.6)に浸漬し、室温で2時間振盪した。プロトプラスト懸濁液を、100 μm および40 μm のメッシュに通してリーフディスクを取り除いた。プロトプラスト懸濁液を60gで5分間遠心し、プロトプラストを沈殿させた。プロトプラストを167mMマンニトールおよび133mM CaCl_2 を含む水溶液に再懸濁し、40gで5分間遠心した。プロトプラストを333mMマンニトールおよび66.7mM CaCl_2 を含む水溶液に再懸濁し、40gで5分間遠心した。プロトプラストをW5 solution (154mM NaCl, 125mM CaCl_2 , 5mM KCl, 2mM Mes-KOH, pH 5.6)に懸濁し、氷上に1時間静置した。プロトプラスト懸濁液を40gで5分間遠心し、プロトプラスト濃度が 2×10^6 個/mlになるように、MaMg solution (400mM マンニトール, 15mM MgCl_2 , and 4mM Mes-KOH, pH 5.6)に懸濁した。

[0081] 上記で作製したGFPレポーター発現ベクター、Stx2eB発現ベクター、改変Stx2eB発現ベクター及びStx2eA発現ベクターを、それぞれ120 μl のプロトプラスト懸濁液と混合した後、140 μl のPEG solution (400mM マンニトール, 100mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, and 40% PEG)を加えて穏やかに混和し、7分間インキュベートした。約20分間かけて1mlのW5 solutionをプロトプラスト懸濁液に添加した。遠心により沈殿させたプロトプラストに、400mM マンニトールとW5 solutionを4:1の割合で混ぜた溶液を1ml添加した。遠心により沈殿させたプロトプラストに、1%スクロース、400mM マンニトールおよび0.3mM カルベニシリンを含むLS培地を1ml添加し、暗所25°Cで24時間培養した。

[0082] (6)ウェスタン解析

遠心により回収したプロトプラストに30 μl のSDS-sample buffer(4% (w/v) SDS, 20% (

w/v) glycerol, 0.05%(w/v) ブロモフェノールブルー, 300mM β -,メルカプトエタノール, 125mM Tris-HCl, pH 6.8)を加え、95°Cで2分間熱変性させ、試料とした。15%アクリルアミドゲルを用いてタンパク質を分離後、エレクトロトランスファー装置を用いてPVDFメンブレン(Hybond-P; Amersham 社)上にタンパク質をブロットした。抗HA抗体(N o. 11 867 423 001, Roche)を用いて、Stx2eB及びStx2eAを検出した。

以下、結果を示す。

[0083] (a) GFP発現ベクターの発現

(1)で作製した各GFP発現ベクターを、レタスのプロトプラストに導入し、レポーター遺伝子を一過的に発現させた。GFPレポーター遺伝子の発現量を解析するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いてGFP蛍光観察を行った(図8)。

細胞質型GFPを発現させた場合、葉緑体周辺の細胞質と思われる領域と核内に蛍光シグナルが検出された。なお、核移行シグナルペプチドを持たなくても、GFPなどの低分子量のタンパク質は核膜孔を通過可能であることが報告されている。

[0084] 次に、小胞輸送経路への輸送シグナルについて検討した。アポプラスト型、小胞体型、液胞型のいずれのタイプのGFPを発現させた場合も、プロトプラスト培養初期においては小胞体と思われる区画に蛍光が確認された。プロトプラストの培養時間が経過するにつれ、アポプラストタイプでは蛍光シグナルが見えなくなり(細胞外に分泌されたと思われる)、液胞タイプでは細胞体積の大部分を占める大きな液胞にシグナルが検出された。一方、小胞体タイプでは小胞体に蛍光がとどまったままであった。

[0085] また、葉緑体移行シグナルペプチドも検討した。葉緑体型GFPを発現した場合、赤色自家蛍光を発する葉緑体領域に緑色シグナルが検出された。

以上の結果から、レタス細胞において、シグナルペプチドの付加によって組み換えタンパク質の局在化制御が可能であることがわかった。

[0086] (b) Stx2eB生産における局在化シグナルおよび翻訳エンハンサーの効果

(2)で作製した各Stx2eB発現ベクターを、レタスのプロトプラストに導入し、Stx2eBを一過的に発現させ、抗HA抗体を用いたウェスタン解析によりStx2eB蓄積量を評価した。結果を図9に示す。

Kozak配列を用いて細胞質型Stx2eBを発現させた場合は、Stx2eBが全く検出さ

れなかったが、小胞体型Stx2eBを発現させた場合は、S. P. が切断されていないStx2eB前駆体(約12kDa、pre-mature)及びStx2eB(約8kDa、mature)が検出された。

NtADH 5'UTRを用いて細胞質型Stx2eBを発現させた場合は、Stx2eBが全く検出されなかったが、小胞体型Stx2eB及び液胞型Stx2eBを発現させた場合には、S. P. が切断されていないStx2eB前駆体及びStx2eBが検出された。また、アポプラスト型Stx2eBを発現させた場合には、Stx2eBが検出された。また、葉緑体型Stx2eBを発現させた場合には、Stx2eBが検出された。

[0087] Kozak-ER(小胞体型)とNtADH-ER(小胞体型)のレーンのバンドの観察から、NtADH 5'UTRを用いることにより、Kozak配列を用いた場合に比して、Stx2eBの発現量が極めて大きくなることが判った。

また、小胞輸送経路にStx2eBを送り込むことにより、植物細胞におけるStx2eBの蓄積量を高められることが判った。なお、小胞輸送経路の3区画(小胞体、アポプラスト、液胞)の違いによる、Stx2eB蓄積量の差は小さかった。

[0088] (c) Stx2eBのコドン改変が発現に及ぼす効果

各コドン改変Stx2eB発現ベクターを、レタスのプロトプラストに導入し、コドン改変Stx2eBを一過的に発現させ、抗HA抗体を用いたウェスタン解析によりStx2eB蓄積量を評価した。結果を図10及び11に示す。

レーン0(ADH-ER-Stx2eB)、レーン1(ADH-ER-mStx2eB1)、レーン2(ADH-ER-mStx2eB2)、レーン3(ADH-ER-mStx2eB3)、レーン4(ADH-ER-mStx2eB4)の全てで、S. P. が切断されていないStx2eB前駆体(約12kDa、pre-mature)及びStx2eB(約8kDa、mature)が検出されたが、レーン2においては、検出量はわずかであった。

これより、配列番号75、77、78の塩基配列をそれぞれ有するADH-ER-mStx2eB1、ADH-ER-mStx2eB3、ADH-ER-mStx2eB4を用いた場合に、Stx2eBタンパク質の蓄積量が特に増大することが判った。

[0089] (d) Stx2eA生産における、翻訳エンハンサーの効果

各Stx2eA発現ベクターを、レタスのプロトプラストに導入し、Stx2eAを一過的に

発現させ、抗HA抗体を用いたウェスタン解析によりStx2eA蓄積量を評価した。結果を図12に示す。

NtADH-ER-Stx2eA(小胞体型)を発現させた場合は、それぞれ約34kDa、約38kDaの位置に2本のバンドが検出された。一方Kozak-ER-Stx2eAを発現させた場合は、Stx2eAの発現量は検出限界以下であった。

これより、NtADH 5'UTRを用いることにより、Kozak配列を用いた場合に比して、Stx2eAの発現量が極めて大きくなることが判った。

[0090] (8) Stx2eB有効生産量の設定及び性能評価

(a) Stx2eB-GST融合タンパク質の精製

Stx2eBサブユニットとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質を作成するため、大腸菌タンパク質発現用ベクターpGEX-6P-1のGST3'側にフレームを併せてStx2eBをサブクローニング後、大腸菌に形質転換した。常法によりIsopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を添加、recombinant (r) Stx2eB-GST融合タンパク質の発現を誘導し、グルタチオンセファロース4Bカラムを用いて以下のようにして精製を行った。

Stx2eB-GST融合タンパク質を大腸菌内で発現させた後、菌体を水溶性のバッファーに懸濁し超音波処理を行ったところ、上清中に該融合タンパク質の存在が少なかったことから、該融合タンパク質は不溶性画分に存在することがわかった。そこで該融合タンパク質を8M尿素で可溶化し、カラムで精製した後、リフォールディングを行った(図13)。

[0091] (b) タンパク質のマウス経鼻投与実験(抗体価の確認)

溶出したStx2eB-GST融合タンパク質について、Stx2eに対する抗体(抗VT2抗体)を用いウェスタンブロットティングを行った。その結果、Stx2eB-GST融合タンパク質およびStx2eBの分子量に一致する特異的な2つのバンドを検出し、該融合タンパク質は抗原性を保持していることを確認した(図14)。

続いて、精製したStx2eB-GST融合タンパク質10, 20, 50 μ gを一週間隔で3回マウスに経鼻接種した。0, 1, 2, 3週間目に採血を行い、該融合タンパク質を抗原としてELISAを行いIgG抗体価を測定した。その結果、該融合タンパク質50 μ g投与区は投与

後1週間目には抗体価の上昇がみられ、2週間目には10、20 μ g投与区でも抗体価の上昇を確認し、3週間目にかけて経時的に抗体価が上昇することがわかった(図15)

。

[0092] (9) Stx2eBの生産

(a) Stx2eB発現バイナリーベクターの構築

植物の安定形質転換体を用いてStx2eBの生産を行うために、ADH-ER-Stx2eBを形質転換用ベクターにサブクローニングした。すなわち、ADH-ER-Stx2eBをXbaIおよびSacIを用いてpBI121(Clontech社)に挿入し、カリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(35S pro.)とパリン合成酵素遺伝子転写ターミネーター(NOS-T)の間に配置し、Stx2eB発現バイナリーベクターを作製した。

[0093] (b) 形質転換アグロバクテリウムの作製

Agrobacterium tumefaciens EHA105 (Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2: 208-218)の単一コロニーを5 mlのYEB培地(Bacto-peptone 5 g/l, Beef extract 5 g/l, Yeast extract 1 g/l, sucrose 5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l)に接種し、28°Cで1晩振盪培養した。この培養液を、500 mlのYEP培地に接種し、600 nmにおける濁度が0.5になるまで28°Cで振盪培養した。培養液を遠心分離(5000 rpm, 10分, 4°C; BECKMAN JLA-10,500ローター)により集菌して上清を捨て、菌体を洗浄するため500 mlの滅菌水を加えて懸濁し、再度遠心分離(5000 rpm, 10分, 4°C; BECKMAN JLA-10,500ローター)により集菌して上清を捨てた。この操作を2回繰り返した後、沈殿に20 mlの冷却した滅菌10% glycerolを加えて懸濁した。ナルゲンチューブに移し遠心分離(5000 rpm, 10 min, 4°C BECKMAN JLA-10,500ローター)により集菌して上清を捨てた。沈殿に3 mlの冷却した滅菌10% Glycerolを加えて懸濁し、40 μ lずつ1.5 ml微小遠心管に分注して、液体窒素で凍結させてから-80°Cで保存した。

コンピテントセルを氷中で解凍後、1~2 μ lの上記バイナリーベクター溶液を加え、氷冷した2 mmキューベットに移した。エレクトロポレーター(BIO RAD、Gene Pulser)により電気パルス(2.5 KV、25 μ F、400 Ω)を与え、ベクターを導入した。1 mlのSOC培地を加え、28°Cで1時間振盪培養した後、スピンドウンして上清を大部分除き菌体

を得て、残った培地に菌体を懸濁して適当な抗生物質を含む LB 寒天培地上に広げ、30℃で2晩培養した。

[0094] (c)形質転換タバコの作製

タバコBY2培養細胞の形質転換は、An (An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. Plant Physiol. 79: 568-570)の方法に従って行った。上記(b)の方法に従って得た形質転換アグロバクテリウムの菌体をカナマイシン100 mg/lを含む5 mlのLB培地で28℃、2晩培養したアグロバクテリウム培養液100 μ lと、培養4日目のタバコBY2培養細胞懸濁液 5~10 mlをシャーレに入れてよく混ぜ、25℃で2晩、暗所下で静置して共存培養した。アグロバクテリウムを除くため、シャーレの中の培養液を 15 mlの遠心管に移して遠心(1000 rpm, 5分, 4℃; BECKMAN GS-6KR centrifuge)し、上清を取り除いた。新しい改変LS培地を入れて遠心分離 (1000 rpm, 5分, 4℃; BECKMAN GS-6KR centrifuge)し、細胞を洗浄した。この操作を4回繰り返し、アグロバクテリウムを除いた後、タバコBY2培養細胞をカナマイシン 100 mg/lの入った改変 LS寒天培地にまき、25℃で暗黒下に静置して培養した。約2-3週間後にカルス化した細胞を新しいプレートに移植し、増殖しているクローンを選択した。カナマイシン100 mg/lを加えた改変LS培地30 mlに移し、継代培養を行った。

[0095] (d)ウェスタン解析

上記で作製した形質転換タバコBY2培養細胞におけるStx2eBの蓄積量を、上記と同様に抗HA抗体を用いたウェスタン解析により評価した。結果を図16に示す。図16の各レーンの数字はそれぞれ独立した系統を表す。「Empty vector」は「ADH-ER-Stx2eB」を含まないベクターpBI121のみを導入したものを示す。

[0096] (10)Stx2eBの生産

(a)コドン改変Stx2eBのデザイン

コドン改変Stx2eBとしてGC含量が高いコドンのうち、レタスにおいて使用頻度の低いコドンを選択した配列をデザインした。作成したコドン改変Stx2eBをmStx2eB5とした(配列番号79)。

[0097] デザインしたmStx2eB5の塩基配列をCLUSTALW (<http://align.genome.jp/>)で比較した(図17)。コドン改変前後のStx2eBの配列XXG/C(Xは任意の塩基)比は、100

%であり、GC比は62.4%であった。

[0098] (b) コドン改変Stx2eBの作製

デザインしたmStx2eB5の塩基配列をもとに、6種類の塩基配列を有するプライマーを作製した。これらのプライマーを使用し、上記(3)におけるコドン改変Stx2eBの作製と同様の方法で、mStx2eB5を得た。

[0099] プライマー

A: 配列番号80

B: 配列番号81

C: 配列番号82

D: 配列番号83

E: 配列番号84

F: 配列番号85

[0100] (c) コドン改変Stx2eB発現バイナリーベクターの構築

植物の安定形質転換体を用いてコドン改変Stx2eBの生産を行うために、上記(3)で作製したmStx2eB1-4、及び(b)で作製したmStx2eB5を用いて、ADH-ER-mStx2eB1-5 (配列番号75~78、86)を形質転換用ベクターにサブクローニングした。すなわち、ADH-ER-mStx2eB1-5をそれぞれXbaIおよびSacIを用いてpBI121(Clontech社)に挿入し、カリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(35S pro.)とパリン合成酵素遺伝子転写ターミネーター(NOS-T)の間に配置し、mStx2eB1-5発現バイナリーベクターを作製した。

[0101] (d) 形質転換アグロバクテリウムの作製

(c)で作製したmStx2eB1-5発現バイナリーベクターを、上記(9)(b)に示した方法と同様にして、Agrobacterium tumefaciens EHA105に導入し、形質転換アグロバクテリウムを得た。

[0102] (e) 形質転換タバコの作製

(b)で得た形質転換アグロバクテリウムの菌体を用いて、上記(9)(c)に示した方法と同様にして、タバコBY2培養細胞に、mStx2eB1-5発現バイナリーベクターをそれぞれ導入し、形質転換タバコを作製した。

[0103] (d)ウェスタン解析

上記で作製した形質転換タバコBY2培養細胞におけるStx2eBタンパク質の蓄積量を、上記と同様に抗HA抗体を用いたウェスタン解析により評価した。結果を図18及び19に示す。図18には、mRNAレベルの測定結果を併せて示す。

図18に示すように、レーン0 (ADH-ER-Stx2eB)、レーン1 (ADH-ER-mStx2eB1)、レーン2 (ADH-ER-mStx2eB2)、レーン3 (ADH-ER-mStx2eB3)、レーン4 (ADH-ER-mStx2eB4)、レーン5 (ADH-ER-mStx2eB5)の全てで、S. P. が切断されていないStx2eB前駆体(約12kDa、pre-mature)及びStx2eB(約8kDa、mature)が検出されたが、レーン2においては、検出されなかった。

図19において、codon 1~5はそれぞれmStx2eB1-5を示す。また、各レーンの数字はそれぞれ独立した系統を表す。mStx2eB1, mStx2eB3, mStx2eB4, mStx2eB5では、いくつかの系統でタンパク質が検出されたが、mStx2eB2では、全ての系統でタンパク質が検出されなかった。タンパク質が検出された系統で、その検出量を比較すると、特にmStx2eB3及びmStx2eB5が多かった。すなわち、レタスでの使用頻度に関わらず、GC含量が高いコドンデザインすることにより、翻訳量が増大することがわかった。

[0104] (11)ブタ浮腫病ワクチン投与試験

(a)ブタ浮腫病ワクチンの製造

上述した(8)(a)で精製したStx2eB-GST融合タンパク質を8 mg /mlの濃度でPBSにけん濁し、ブタ浮腫病ワクチンとした。

[0105] (b)浮腫病菌カプセルの作製

[菌種]

ブタ由来ベロ毒素産生Escherichia coli (VTEC) No.1362-1 (40日齢死亡豚由来)

血液型:O139; fedA, +

毒素:stx2e, +; ST, +; LT, -

[作製]

上記No.1362-1菌株をTSブロス培地で37℃、4時間培養した。培養後、遠心分離を行い、沈殿を脂溶性カプセルに入れた。

[0106] (c)ワクチン及び浮腫病菌の投与

養豚場で飼育されている健康なほ乳期子豚を3頭の母豚から6頭ずつ合計18頭選抜し、表4に示すように5群に分けた。この際、異なる母豚由来の子豚が各群に含まれるように、また雌雄の何れもが各群に含まれるように分けた。2～4群の子豚には、6、12、18日齢で、表4に示す所定量(1回当たり)のブタ浮腫病ワクチンをピペットを用いて点鼻投与し、21日齢まで養豚場にて母豚につけて飼育を行った。1、5群の子豚には、PBS 0.5mlを同様の方法で点鼻投与した。子豚が21日齢になったところで、子豚を母豚から離して、保温灯で温度管理されたコンクリート床製オガコ敷き子豚房に群ごとに収容して飼育した。飼料は、SDSNo. 1(日本配合飼料株式会社製)を用い、飼料及び水は自由摂取させた。なお、飼育期間中、飼料摂取量(質量)及び体重を記録した。収容から4日経過後、1～4群の子豚に、1日1回、3日間(25～27日齢の間)浮腫病菌カプセルを強制経口投与した。5群には、生理食塩水を腸溶性カプセルに入れて強制投与した。

[0107] [表4]

試験群	ブタ浮腫病ワクチン	浮腫病菌投与	頭数
1	無投与	有(3日間)	3
2	1 m g / 頭	有(3日間)	4
3	4 m g / 頭	有(3日間)	4
4	1 6 m g / 頭	有(3日間)	4
5	無投与	無(生理食塩水投与3日間)	3

[0108] 浮腫病菌の強制投与0日目から11日目まで、毎日、臨床観察を行った。観察は、浮腫病の臨床症状として知られている、目周囲の浮腫、神経症状、運動機能、姿勢、糞便性状、食欲、呼吸状態の項目について行い、以下の基準に基づいて、臨床症状スコアをつけた。

目周囲の浮腫(0:なし 1:軽度 2:中度 3:重度)

神経症状(0:なし 1:軽度 2:中度 3:重度)

運動機能(0:正常 1:減退 2:消失)

姿勢(0:正常 1:犬座 2:腹臥・横臥)

糞便性状(0:正常 1:軟便 2:泥状便 3:水様・粘血便)

食欲(0:正常 1:やや不振 2:不振 3:廃絶)

呼吸状態(0:正常 1:やや速拍 2:速拍)

[0109] また、浮腫病菌の強制投与0、3、7及び11日目に糞便を、浮腫病菌の強制投与0及び11日目に血液を採取した。

[0110] (d)試験結果

(i)抗体価の測定

浮腫病菌の強制投与0日目に採取した糞便中のStx特異的IgAの抗体価をELISAにより測定した。なお、糞便は、9倍量のPBSで希釈後、懸濁し、遠心分離して上清を回収し、測定試料とした。結果を図20に示す。また、浮腫病菌の強制投与0日目に採取した血液中のStx特異的IgGの抗体価をELISAにより測定した。結果を図21に示す。抗体価は、個体差が大きく群間で有意差はなかったが、浮腫病ワクチンを投与した群では高値を示す個体が見られた。

(ii)浮腫病菌の検出

浮腫病菌の強制投与3日目に採取した糞便中の浮腫病菌遺伝子を定量し、浮腫病菌数を求めた。すなわち、糞便中のDNAをQUICK GENE (富士フィルム)を用いて抽出し、リアルタイムPCR(Tsukahara et al. (2007)に準拠)を用いて浮腫病菌遺伝子を定量し、浮腫病菌数を求めた。結果を図22に示す。浮腫病菌を投与した1～4群の個体について、浮腫病菌への感染が確認された。

(iii)飼料要求率の算出

飼料摂取量及び体重の測定結果から、浮腫病菌の強制投与の日前4～1日(d-4～-1)、浮腫病菌の強制投与の0～3日目(d0～3)、4～7日目(d4～7)、8～11日目(d8～11)の飼料要求率を求めた。また上記全期間(d-4～11)の飼料要求率を求めた。なお、飼料要求率は、一定期間における1kgの体重増加に要した飼料摂取量で表される。

飼料要求率＝飼料摂取量／増体重

全期間の飼料要求率を図23に、飼料要求率の推移を図24に示す。全期間の飼料要求率は、浮腫病ワクチン無投与で浮腫病菌に感染した1群が最も大きく、浮腫病ワクチンを4mg／頭で投与した3群が最も小さかった。また、1群は、浮腫病菌の投与0～3日目に極めて大きい飼料要求率を示した。これは浮腫病菌感染により下痢が引

き起こされ、飼料摂取量に応じた体重増加がみられず、飼料要求率が高くなったものと思われる。

[0111] (iv) 臨床観察

各項目について得た臨床症状スコアから、日ごとに、各群の子豚1頭当たりの平均臨床症状スコアを算出した。平均臨床症状スコアの推移を図25に示す。また、子豚1頭当たりの全期間(浮腫病菌投与0～11日目)の合計臨床症状スコアの平均も算出した。これを図26に示す。浮腫病ワクチン無投与の1群の子豚においては、浮腫病菌投与1～3日目にかけて浮腫病の臨床症状が出現、悪化し、11日目まで同様の臨床症状が観察された。浮腫病ワクチンを1mg投与した2群の子豚においては、浮腫病菌投与1～4日目にかけて浮腫病の臨床症状が出現、悪化し、11日目まで同様の臨床症状が観察された。一方、浮腫病ワクチンを4mg投与した3群の子豚、及び浮腫病ワクチンを16mg投与した4群の子豚、浮腫病菌非感染の5群の子豚においては、全期間に渡って、浮腫病の臨床症状はあまり観察されなかった。特に、これらの群では、浮腫病に特徴的な目周囲の浮腫は全く観察されなかった。浮腫病ワクチン無投与の1群の子豚、及び浮腫病ワクチンを16mg投与した4群の子豚の11日目の写真を図27に示す。浮腫病ワクチン無投与の1群の子豚は、目周囲に重度の浮腫が見られ、水様の下痢を起こしている。一方、浮腫病ワクチンを16mg投与した4群の子豚は、目周囲に浮腫は見られず、下痢も起こしていない。

また、全期間の合計臨床症状スコアからも、浮腫病ワクチンを投与することにより、浮腫病の臨床症状を緩和、又は抑制できることが明らかとなった。特に、3回の投与においては、浮腫病ワクチンを1回当たり4mg以上投与することにより、浮腫病の臨床症状を効果的に抑制できることが明らかとなった。

産業上の利用の可能性

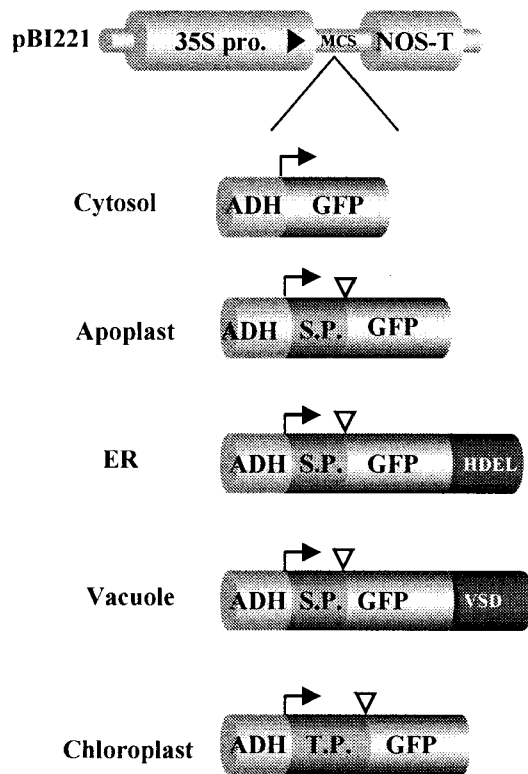
[0112] 本発明のDNA構築物を用いて、植物等を形質転換することにより、効率良くStx2 eタンパク質を生産する形質転換体を得ることができる。本発明のDNA構築物を用いれば、レタス等の栽培コストが低い植物を用いて、ブタ浮腫病ワクチンを効率良く製造することができる。また、本発明のブタ浮腫病ワクチンを用いれば、簡便かつ効果的にブタ浮腫病を防除することができる。

請求の範囲

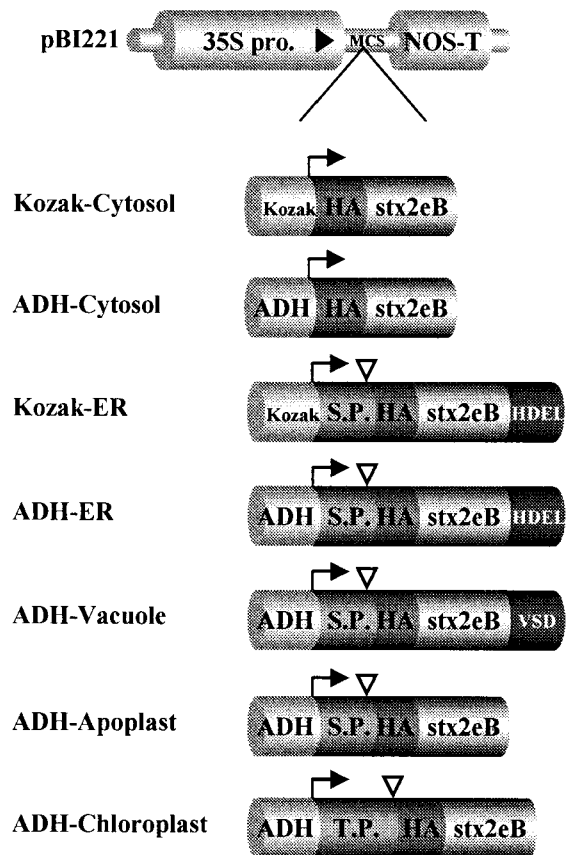
- [1] 植物由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5'ー非翻訳領域、及び該領域に発現可能に連結された、アミノ末端に植物由来の分泌シグナルペプチドが付加されたStx2eタンパク質をコードするDNAを含むDNA構築物。
- [2] 前記アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の5'ー非翻訳領域が、タバコ由来である、請求項1に記載のDNA構築物。
- [3] 前記分泌シグナルペプチドが、タバコ由来である、請求項1又は2に記載のDNA構築物。
- [4] 前記Stx2eタンパク質が、Stx2eタンパク質のBサブユニットである、請求項1～3の何れか一項に記載のDNA構築物。
- [5] 前記Stx2eタンパク質は、カルボキシル末端に小胞体残留シグナルペプチド又は液胞移行シグナルペプチドが付加された、請求項1～4の何れか一項に記載のDNA構築物。
- [6] 小胞体残留シグナルペプチドは、カルボキシル末端にKDEL配列又はHDEL配列を含む、請求項5に記載のDNA構築物。
- [7] 液胞移行シグナルペプチドがタバコ由来である、請求項5に記載のDNA構築物。
- [8] 配列番号12で表される塩基配列を有する、請求項1～7の何れか一項に記載のDNA構築物。
- [9] 配列番号23、24、75、77、78、86の何れかで表される塩基配列を有する、請求項5に記載のDNA構築物。
- [10] 請求項1～9の何れか一項に記載のDNA構築物を含む組換えベクター。
- [11] 請求項10に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- [12] 形質転換体が形質転換植物細胞又は形質転換植物である、請求項11に記載の形質転換体。
- [13] 植物がレタス(*Lactuca sativa*)である、請求項12に記載の形質転換体。
- [14] 請求項12又は13に記載の形質転換体から得られる種子。
- [15] 請求項11～13の何れか一項に記載の形質転換体を含む、ブタ浮腫病ワクチン。
- [16] 請求項15に記載のブタ浮腫病ワクチンをブタに投与することを特徴とする、ブタ浮

腫病の防除方法。

[図1]



[図2]



[図3]

```

stx2eB      ATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAGATTGAGTTTCCAAGTATAATGAGGATAATACC
mstx2eB1    ATGGCAGCAGATTGCGCTAAGGGTAAGATTGAGTTCTCCAAGTACAACGAGGATAACACC
mstx2eB2    ATGGCAGCAGATTGTGCAAAAGGTAAGATTGAATTTCTAAATATAATGAAGATAATACA
mstx2eB3    ATGGCCGCCGACTGCGCCAAGGGGAAGATCGAGTTCTCCAAGTACAACGAGGACAACACC
mstx2eB4    ATGGCCGCCGATTGCGCCAAGGGTAAGATCGAATTCTCCAAGTACAACGAAGATAACACT
            *****

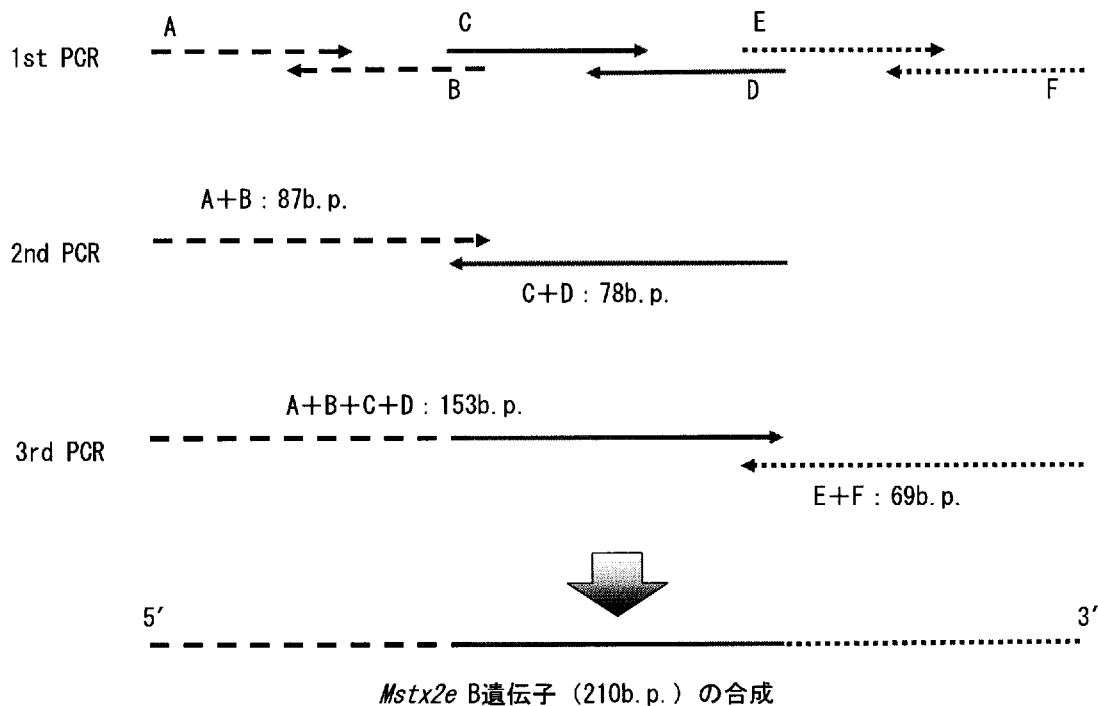
stx2eB      TTTACTGTGAAGGTGTCAGGAAGAGAATACTGGACGAACAGATGGAATTTGCAGCCATTG
mstx2eB1    TTCACAGTGAAGGTGTCAGGAAGGGAGTACTGGACAAACAGGTGGAAC TTGCAACCATTG
mstx2eB2    TTTACAGTTAAAGTTTCTGGTAGAGAATATTGGACAAATAGATGGAATCTTCAACCACTT
mstx2eB3    TTCACCGTGAAGGTGTCCGGGAGGGAGTACTGGACCAACAGGTGGAACCTCCAGCCCTC
mstx2eB4    TTCACTGTTAAGGTTTCCGGTCGTGAATACTGGACTAACC GTTGAACCTCCAACCACTC
            ** ** ** **

stx2eB      TTACAAAGTGCTCAGCTGACAGGGATGACTGTAACAATCATATCTAATACCTGCAGTTCA
mstx2eB1    TTGCAAAGCGCTCAACTCACAGGGATGACAGTGACAATCATCTCTAACACCTGCAGCTCA
mstx2eB2    CTTCAATCTGCACAAC TTACAGGTATGACAGTTACAATTATTTCTAATACATGTTCTTCT
mstx2eB3    CTCCAGTCCGCCAGCTCACC GGATGACCGTGACCATCATCTCCAACACCTGCTCCTCC
mstx2eB4    CTCCAATCCGCCAACTCACTGGTATGACTGTTACTATCATCTCCAACACTTGCTCCTCC
            * **      *

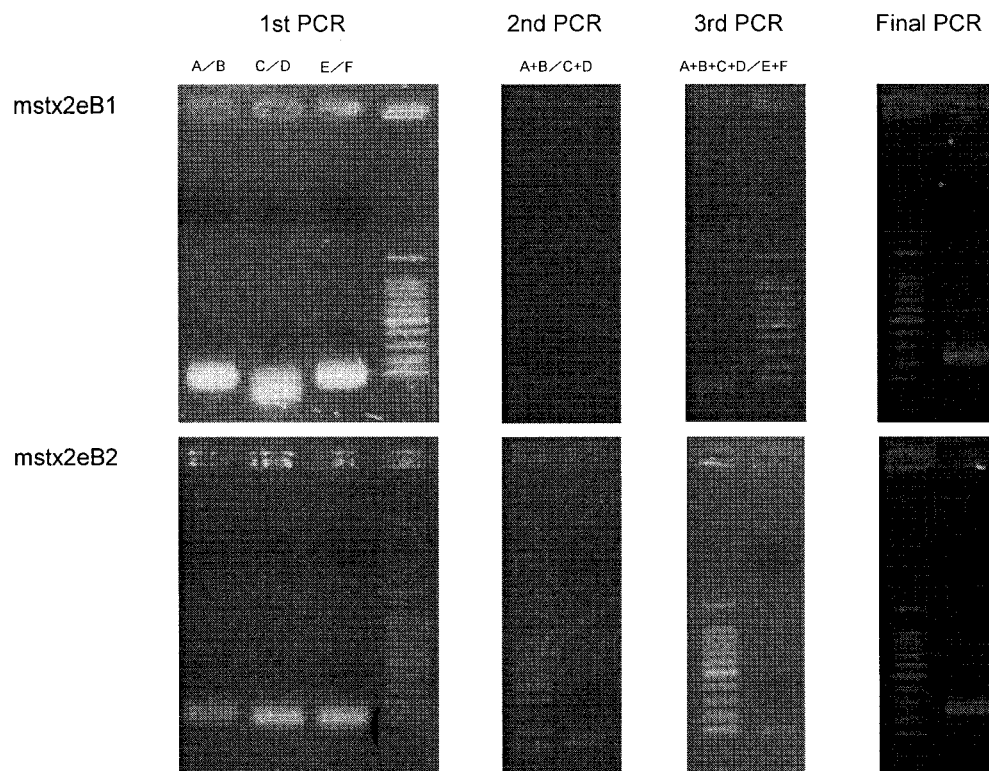
stx2eB      GGCTCAGGCTTTGCCCAGGTGAAGTTTAAAC
mstx2eB1    GGGTCAGGTTTCGCCCAAGTGAAGTTCAAC
mstx2eB2    GGTTCTGGTTTGCACAAGTTAAATTTAAT
mstx2eB3    GGGTCCGGTTTCGCCCAGGTGAAGTTCAAC
mstx2eB4    GGTTCCGGTTTCGCCCAAGTTAAGTTCAAC
            ** ** **

```

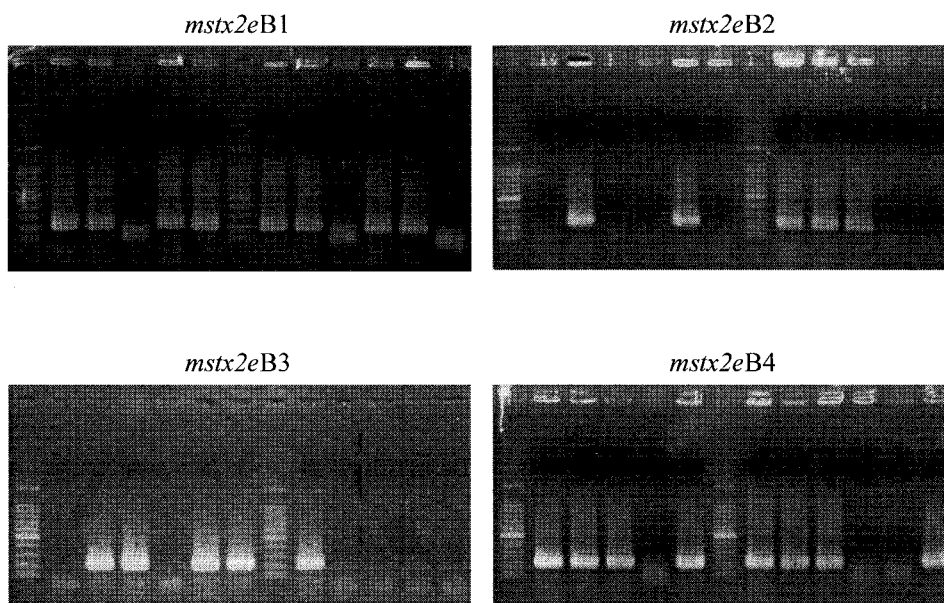
[図4]



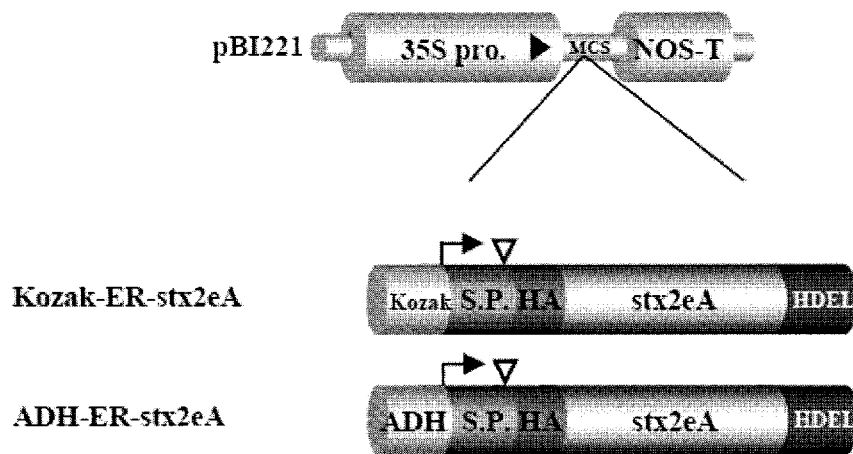
[[図]5]



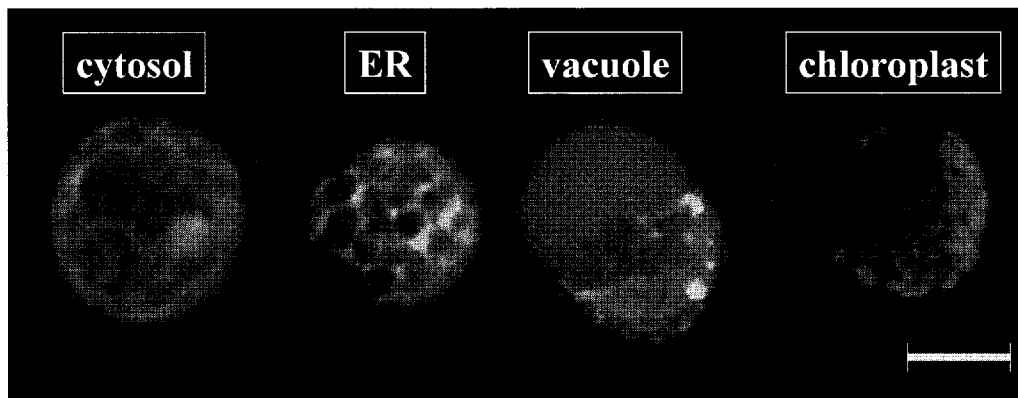
[[図]6]



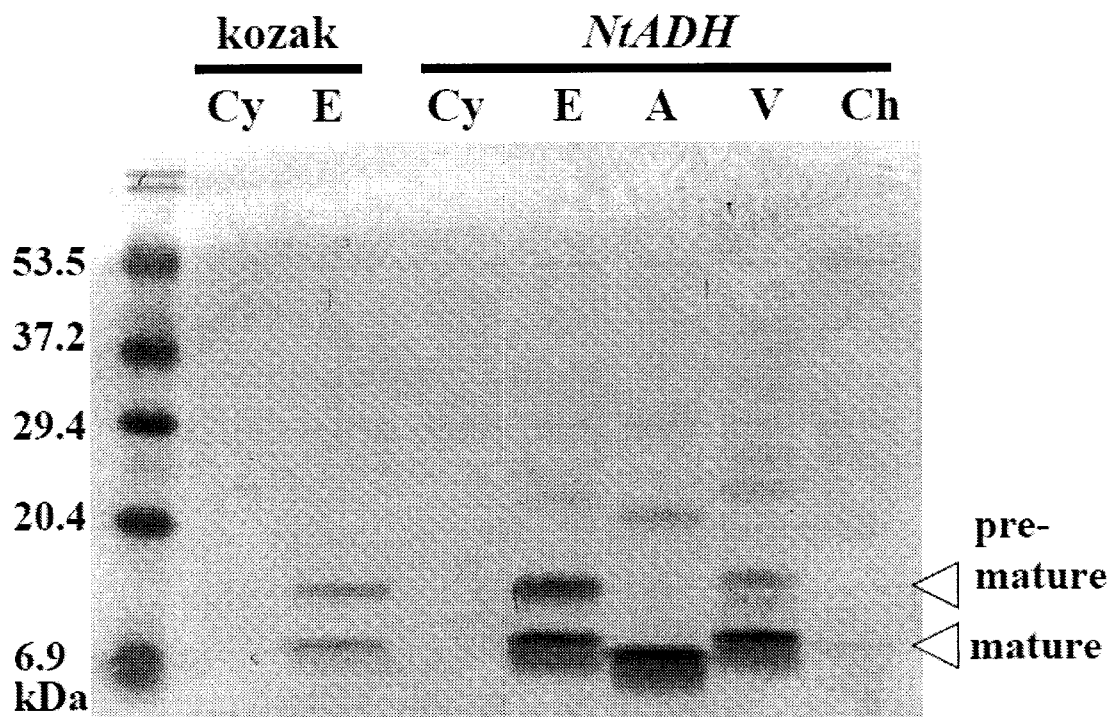
[[図7]]



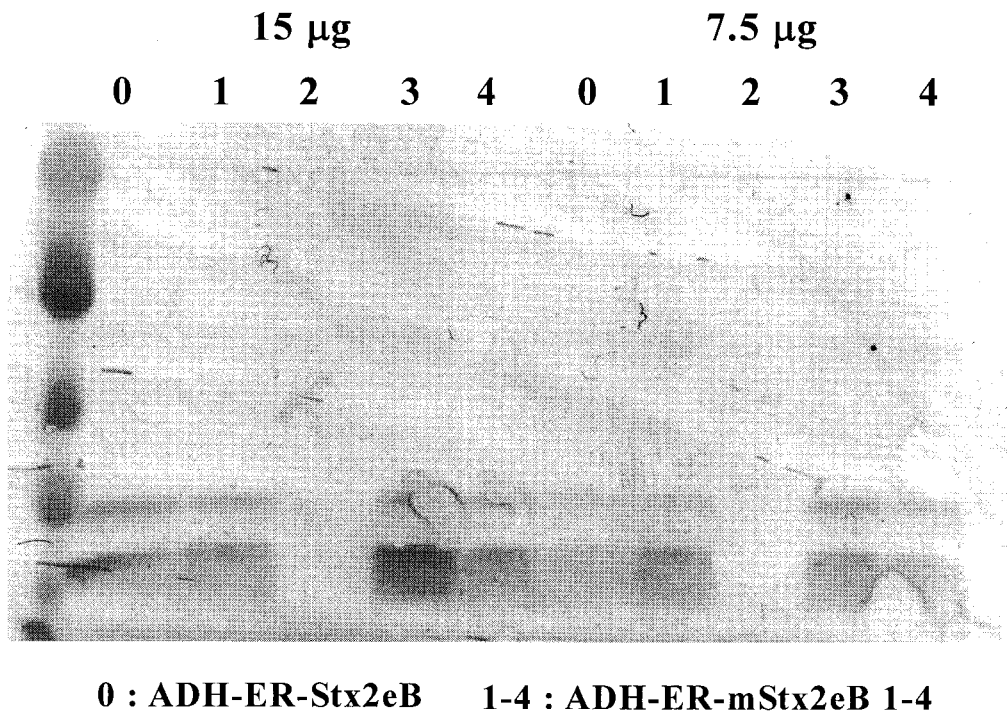
[[図8]]



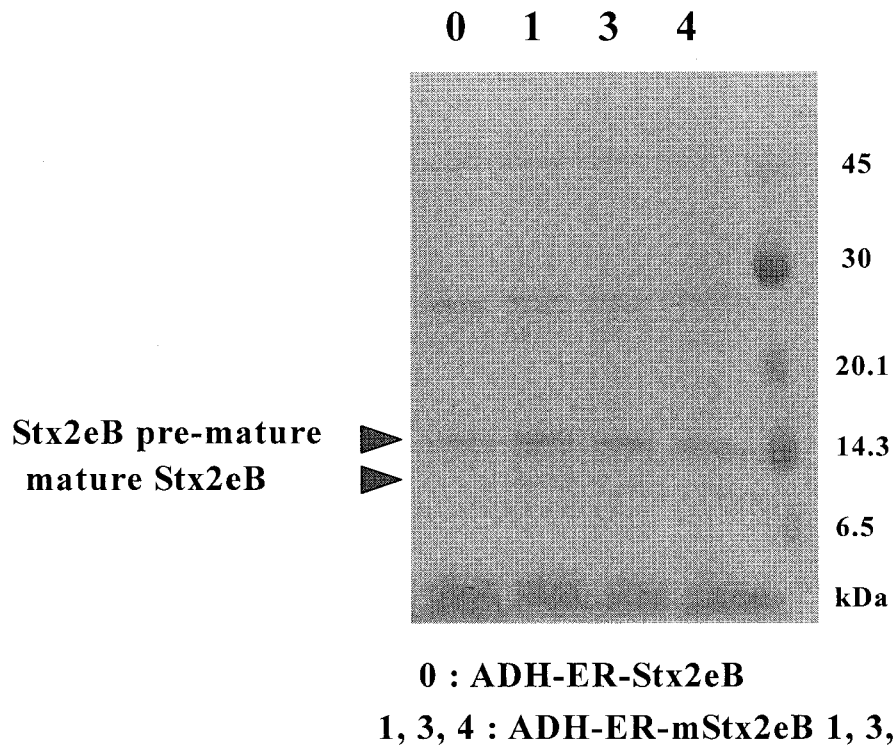
[[図9]]



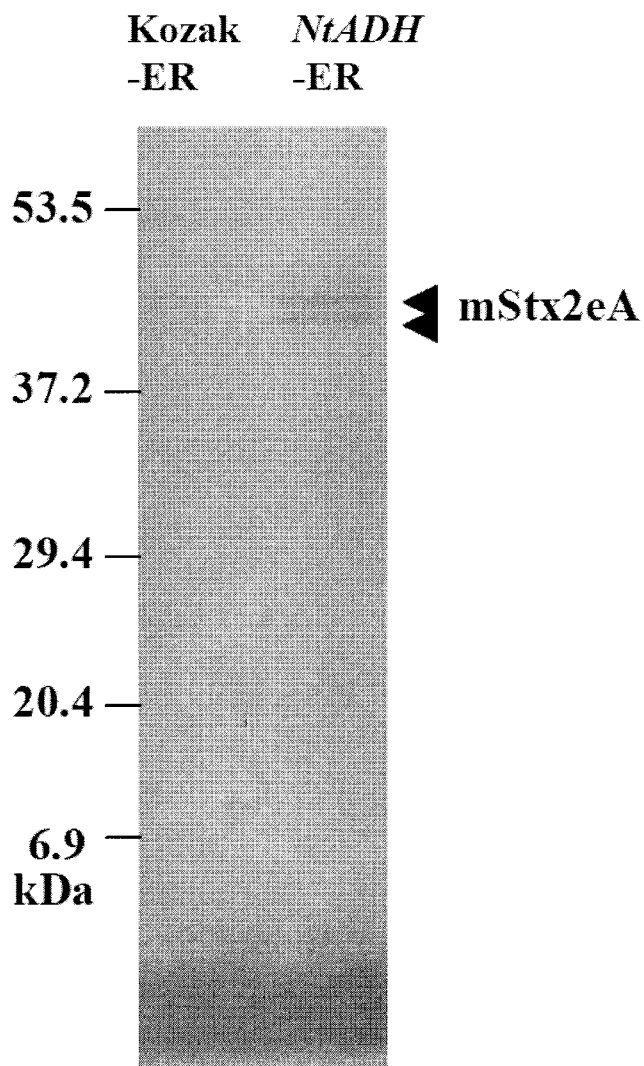
[図10]



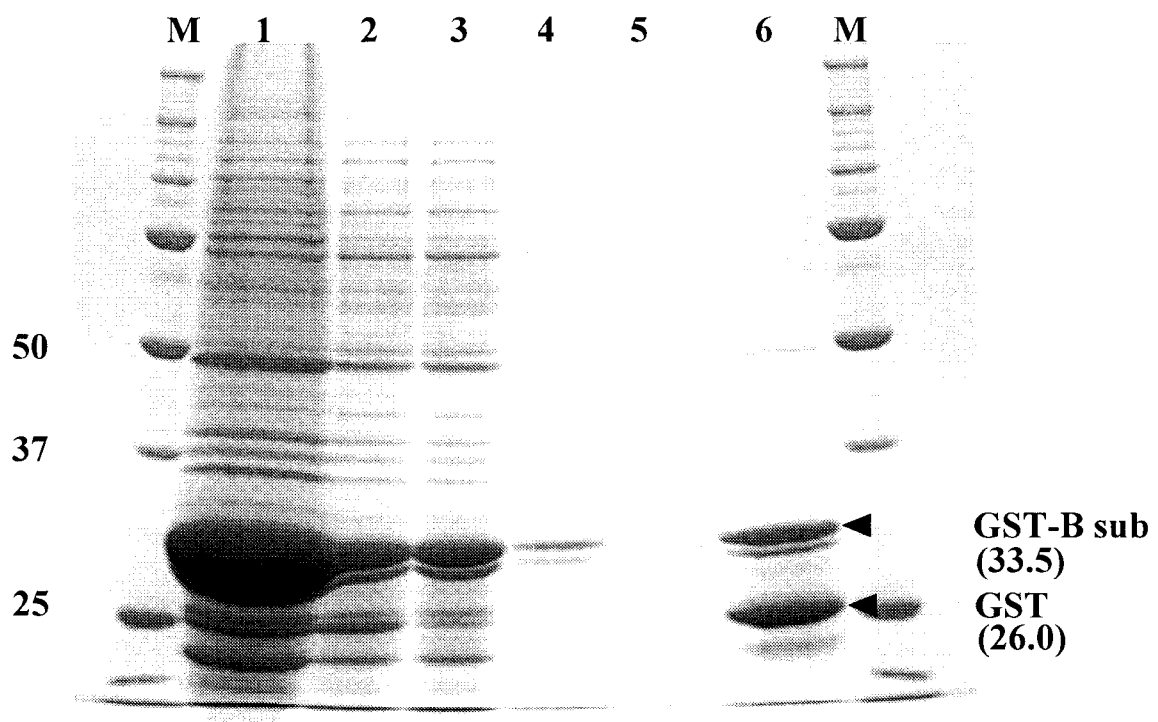
[図11]



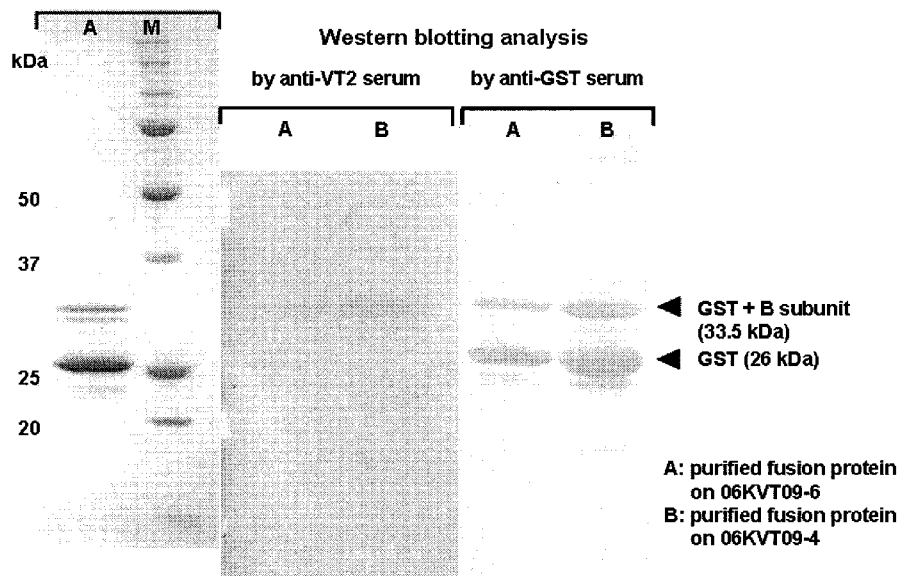
[図12]



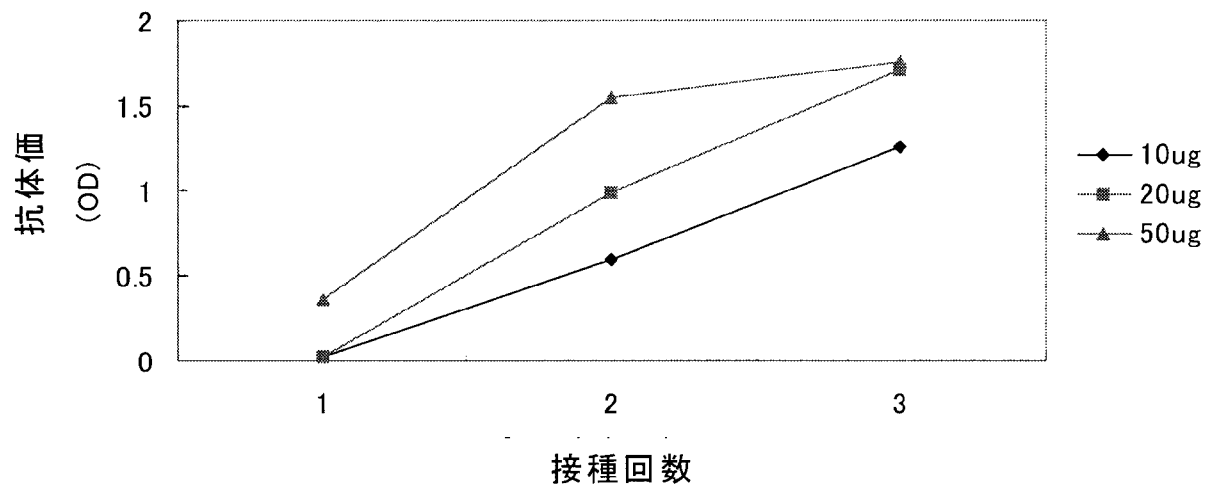
[図13]



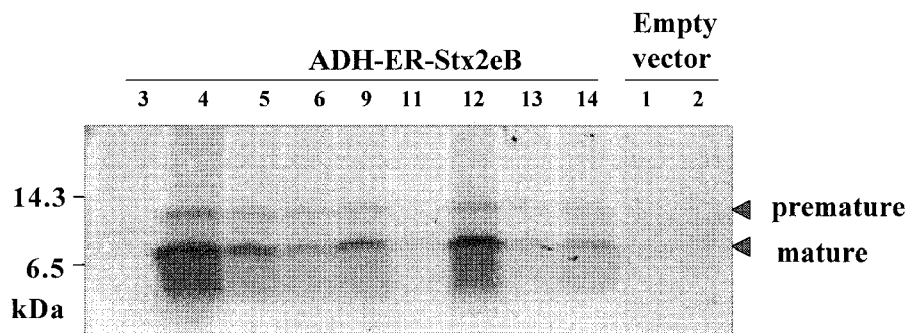
[図14]



[図15]



[図16]



[図17]

Stx2eB	ATG GCG GCG GAT TGT GCT AAA GGT AAA GAG TAT AAT GAG GAT AAT ACC
mStx2eB5	ATG GCG GCG GAC TGC GCG AAG GGC AAG ATC GAG TTC TCG AAG TAC AAC GAG GAC AAC ACG
	*** ** ** ** **
Stx2eB	TTT ACT GTG AAG GTG TCA GGA AGA GAA TAC TGG ACG AAC AGA TGG AAT TTG CAG CCA TTG
mStx2eB5	TTC ACG GTC AAG GTC TCG GGC CGC GAG TAC TGG ACG AAC CGC TGG AAC CTG CAG CCG CTG
	** ** ** ** **
Stx2eB	TTA CAA AGT GCT CAG CAG CTG ACA GGG ATG ACT GTA ACA ATC ATA TCT AAT ACC TGC AGT TCA
mStx2eB5	CTG CAG TCG GCG CAG CTG ACG GGC ATG ACG GTC ACG ATC ATC TCG AAC ACG TGC TCG TCG
	* ** ** ** **
Stx2eB	GGC TCA GGC TTT GCC CAG GTG AAG TTT AAC
mStx2eB5	GGC TCG GGC TTC GCG CAG GTC AAG TTC AAC
	** ** ** ** **

[図18]

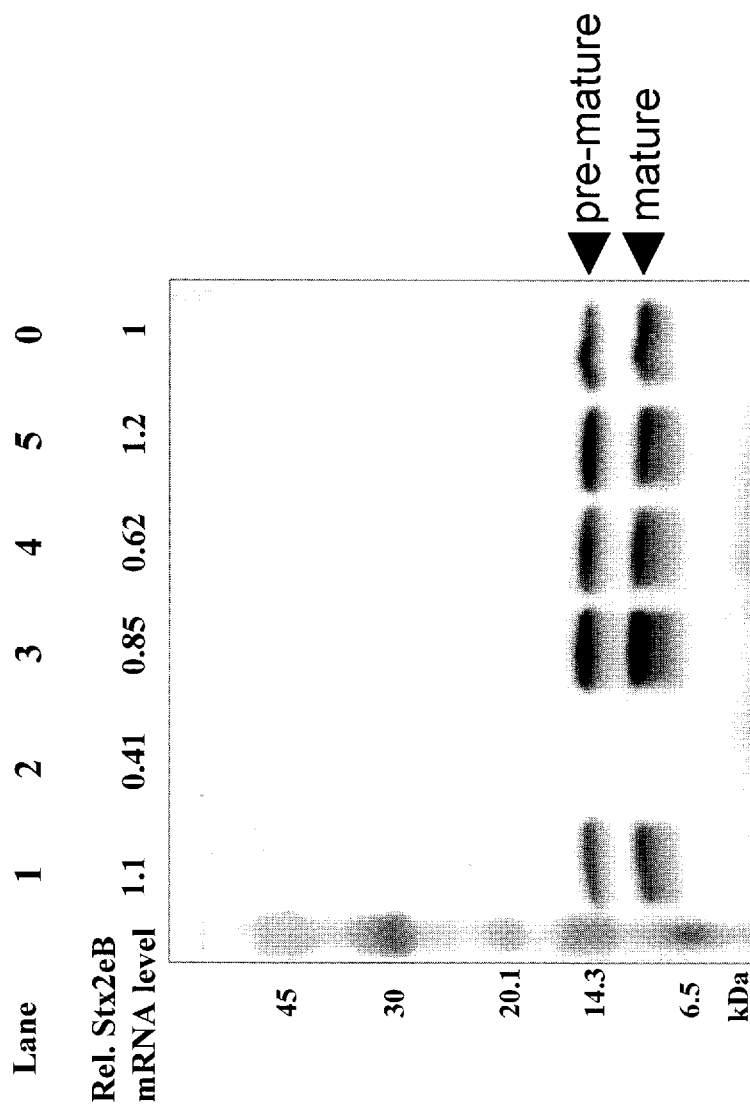
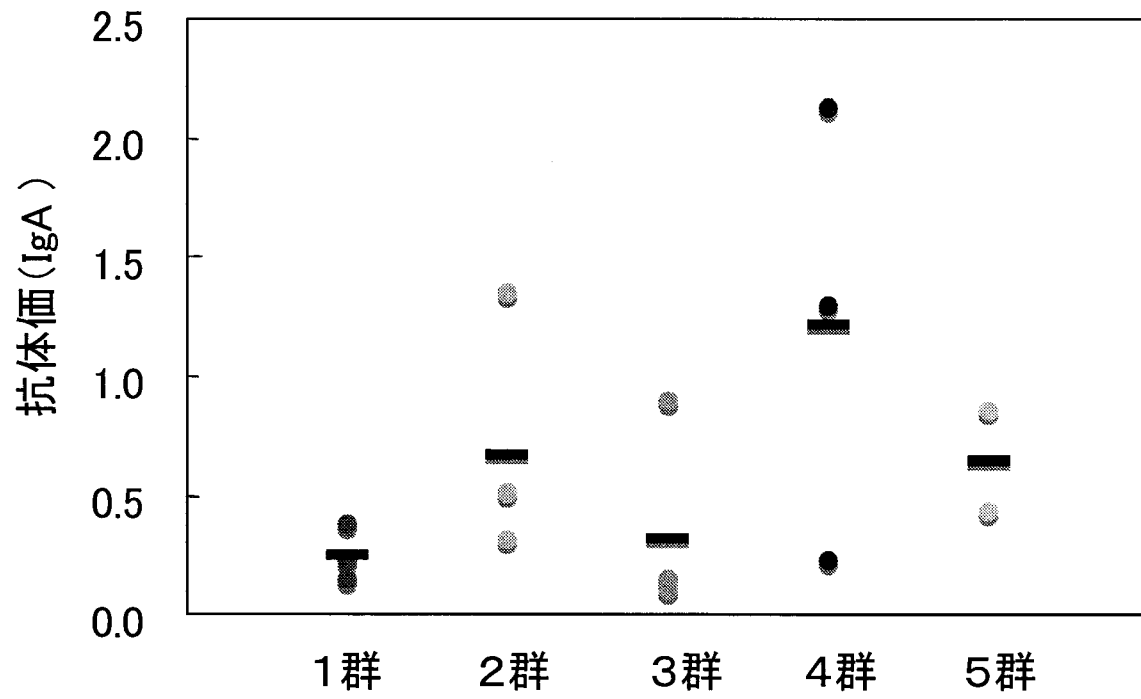
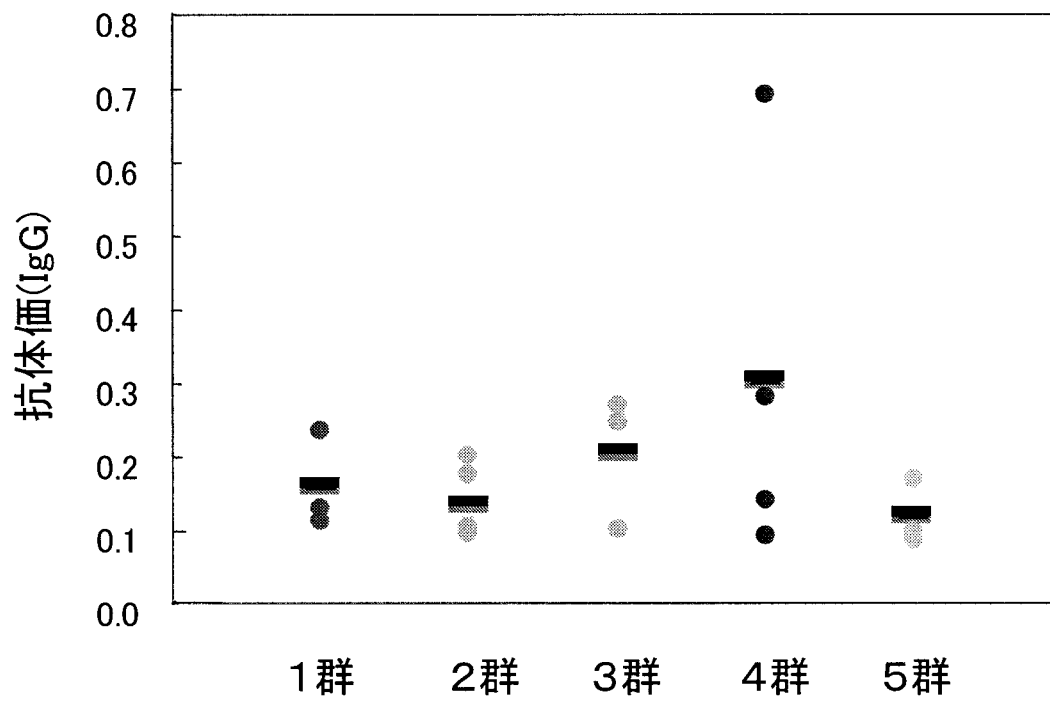


Figure 1 consists of three panels of gel electrophoresis images showing RNA products from the 5' region of the 28S rDNA. Each panel has lanes labeled 1 through 9 at the top. Above the lanes, there are labels for 'pre-mature' and 'mature' RNA, with arrows pointing to specific bands. Dashed lines connect bands across the panels, indicating the same RNA species. The top panel shows bands for pre-mature and mature RNA. The middle panel shows bands for pre-mature and mature RNA. The bottom panel shows bands for pre-mature and mature RNA.

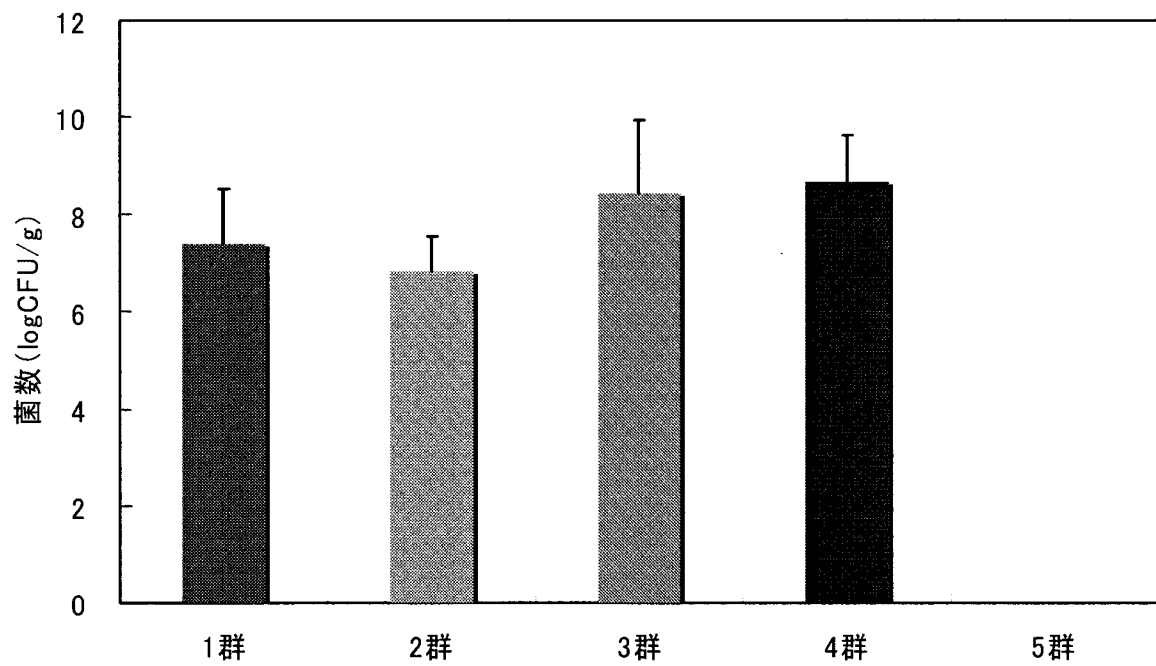
[図20]



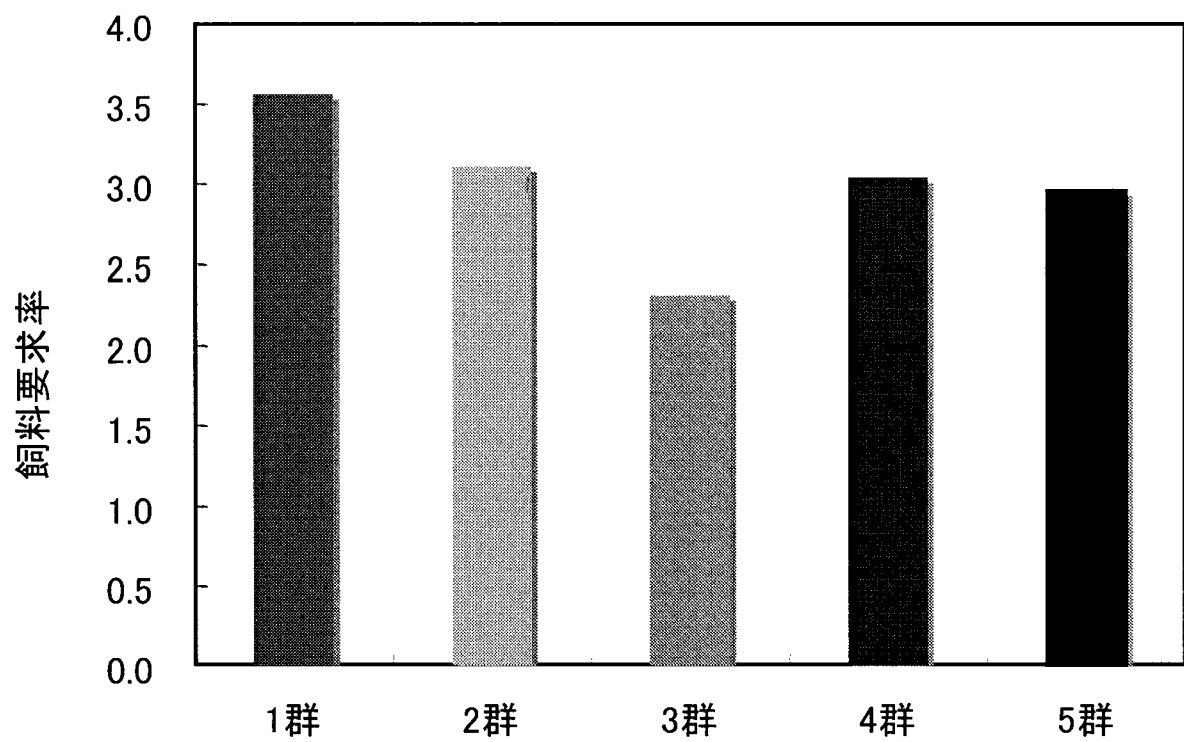
[図21]



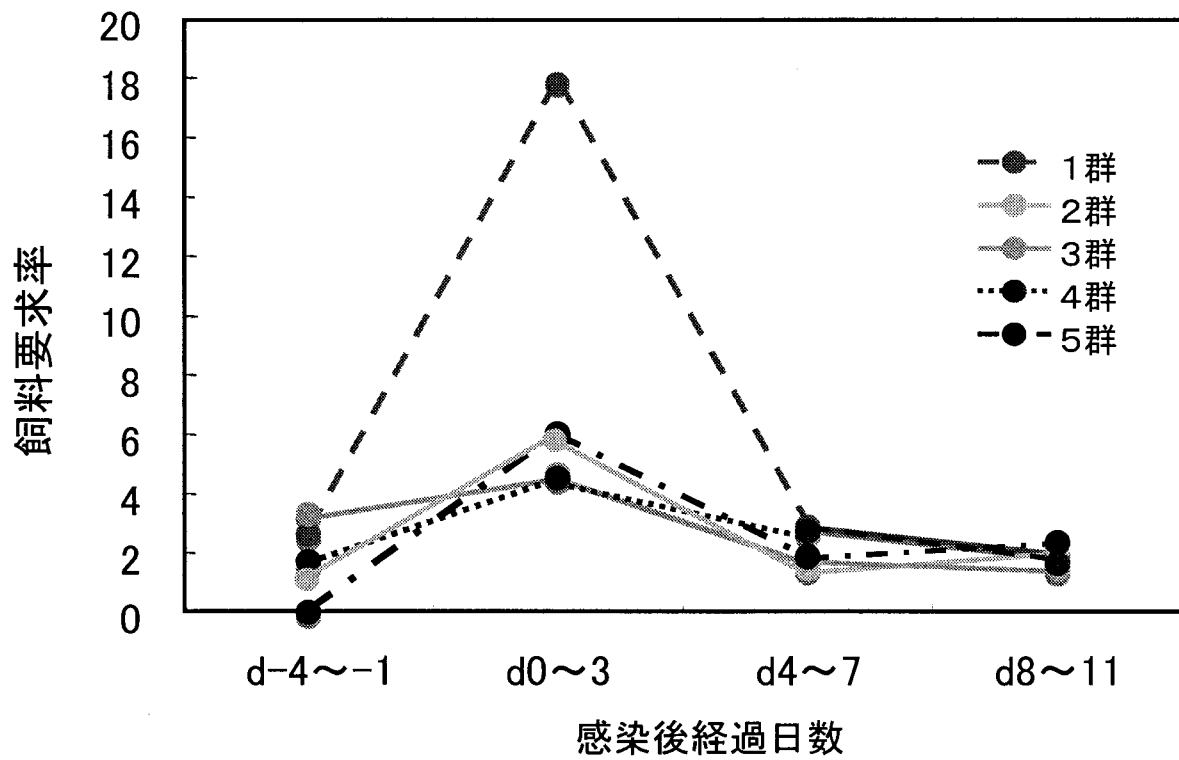
[図22]



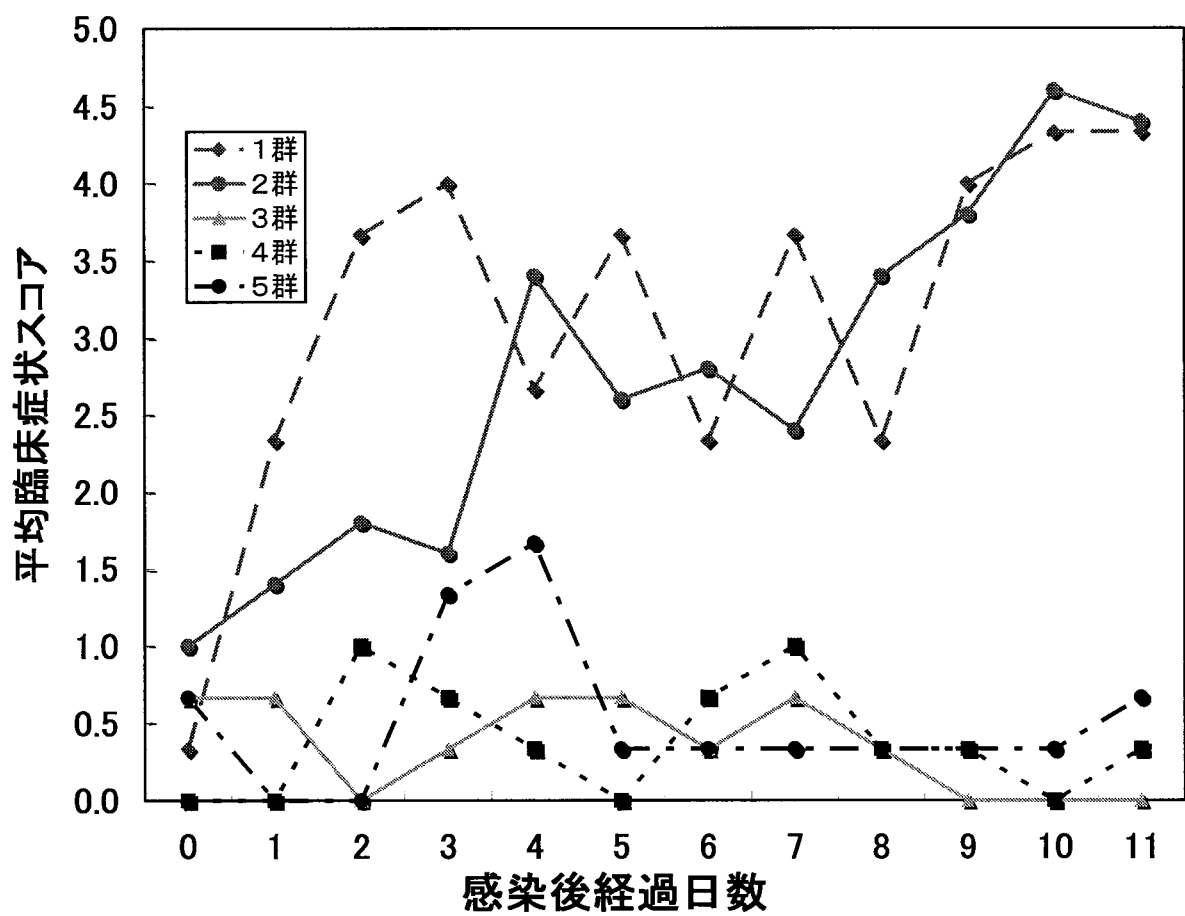
[図23]



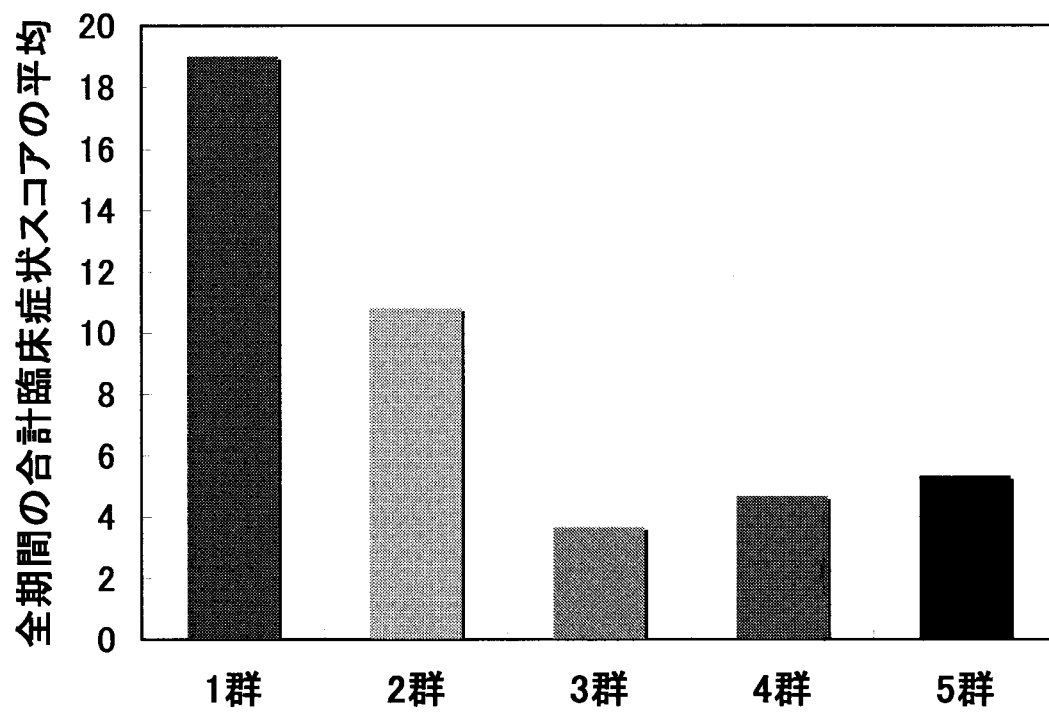
[図24]



[図25]



[図26]

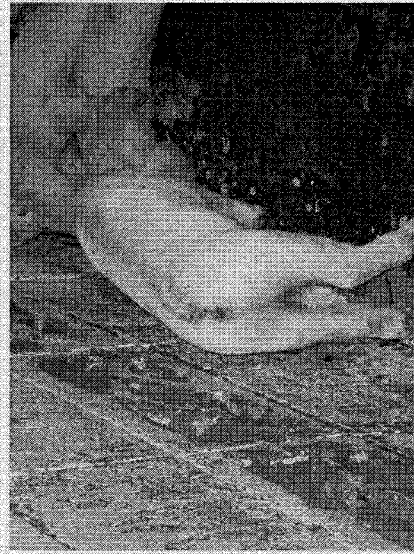


[図27]

4群(ワクチン 16mg投与)



目周囲の浮腫なし



下痢なし

1群(ワクチン無投与)



眼周囲の浮腫あり



下痢あり

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055550

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, A61K35/74(2006.01)i, A61K39/108(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P39/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A01H5/00, A61K35/74, A61K39/108, A61P31/04, A61P39/02, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Matsui T et al., High-efficiency secretory production of peroxidase Cla using vesicular transport engineering in transgenic tobacco, J. Biosci. Bioeng., 2006.08, Vol.102, No.2, pp.102-109	1-16
Y	Makino S et al., Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing Escherichia coli is a vaccine candidate for porcine edema disease, Microb. Pathog., 2001, Vol.31, No.1, pp.1-8	1-16
Y	JP 2006-524506 A (Protalix Ltd.), 02 November, 2006 (02.11.06), & US 2006/0204487 A1 & US 2005/0032211 A1 & EP 1618177 A1 & EP 1718726 A1 & WO 2004/096978 A2	7-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 April, 2008 (18.04.08)

Date of mailing of the international search report
01 May, 2008 (01.05.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055550

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kim TG et al., Synthesis and assembly of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (Lactuca sativa), Protein Expr. Purif., 2007.01, Vol.51, No.1, pp.22-27	9-16
P,X	Kazutoshi SAWADA et al., "Lettuce ni yoru Vaccine Seibun Seisan Gijutsu Kaihatsu", Preprints of Biotechnology Symposium, 06 November, 2007 (06.11.07), Vol.25, pages 107 to 108	1-16
P,X	Kazutoshi SAWADA et al., "Kumikae Lettuce ni yoru Kachikuyo Keiko Vaccine Tanpakushitsu Seisan no Kenkyu Kaihatsu", Preprints of Biotechnology Symposium, 06 November, 2007 (06.11.07), pages 28 to 31	1-16
P,X	Takeshi MATSUI et al., "Shokubutsu Kojo ni Kyosuru Buta Fushubyo Vaccine Seisan Lettuce no Sakusei", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 02 August, 2007 (02.08.07), Vol.59, page 146	1-16
A	WO 2001/052886 A1 (ALFRED HOSPITAL), 26 July, 2001 (26.07.01), & US 2003/0191076 A1 & EP 1409011 A1	1-16
A	JP 2003-116385 A (President of University of the Ryukyus), 22 April, 2003 (22.04.03), (Family: none)	1-16
A	JP 9-505467 A (E.I. Du Pont De Nemours & Co.), 03 June, 1997 (03.06.97), & WO 1995/013389 A1 & EP 0728213 A1 & US 5908975 A	1-16
A	JP 2003-180354 A (Syngenta Participations AG.), 02 July, 2003 (02.07.03), & US 6054637 A & EP 0462065 A2	1-16
A	JP 5-49482 A (Institut fuer Genbiologische Forschung Berlin GmbH), 02 March, 1993 (02.03.93), & US 5436394 A & US 5917127 A & EP 0442592 A2	1-16
A	Kang TJ et al., Enhanced expression of B-subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence, Appl. Biochem. Biotechnol., 2004, Vol.117, No.3, pp.175-187	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055550

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-506432 A (Syngenta Participations AG.), 04 March, 2004 (04.03.04), & EP 1311162 A2 & WO 2002/015701 A2	1-16
A	JP 2006-515169 A (University of Bath), 25 May, 2006 (25.05.06), & US 2004/0103455 A1 & EP 1563072 A2 & WO 2004/044217 A2	1-16
A	WO 2000/075345 A1 (LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG.), 14 December, 2000 (14.12.00), & EP 1057895 A1 & EP 1183374 A1	1-16
A	Satoh J et al., The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant, J. Biosci. Bioeng., 2004, Vol.98, No.1, pp.1-8	1-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, A61K35/74(2006.01)i, A61K39/108(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P39/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09, A01H5/00, A61K35/74, A61K39/108, A61P31/04, A61P39/02, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CA(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, JSTPlus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Matsui T et al., High-efficiency secretory production of peroxidase Cla using vesicular transport engineering in transgenic tobacco, J. Biosci. Bioeng., 2006.08, Vol.102, No.2, pp.102-109	1-16
Y	Makino S et al., Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing Escherichia coli is a vaccine candidate for porcine edema disease, Microb. Pathog., 2001, Vol.31, No.1, pp.1-8	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 8 . 0 4 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 5 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

山形 亜希子

4 B

3 4 3 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2006-524506 A (プロタリクス リミテッド) 2006. 11. 02, & US 2006/0204487 A1 & US 2005/0032211 A1 & EP 1618177 A1 & EP 1718726 A1 & WO 2004/096978 A2	7-16
Y	Kim TG et al., Synthesis and assembly of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (Lactuca sativa), Protein Expr. Purif., 2007. 01, Vol. 51, No. 1, pp. 22-27	9-16
P, X	澤田和敏ほか, レタスによるワクチン成分生産技術開発, バイオテ クノロジーシンポジウム予稿集, 2007. 11. 06, Vol. 25, pp. 107-108	1-16
P, X	澤田和敏ほか, 組換えレタスによる家畜用経口ワクチンタンパク質 生産の研究開発, バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 2007. 11. 06, pp. 28-31	1-16
P, X	松井健史ほか, 植物工場に供するブタ浮腫病ワクチン生産レタスの 作製, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2007. 08. 02, Vol. 59, p. 146	1-16
A	WO 2001/052886 A1 (ALFRED HOSPITAL) 2001. 07. 26, & US 2003/0191076 A1 & EP 1409011 A1	1-16
A	JP 2003-116385 A (琉球大学長) 2003. 04. 22, (ファミリーなし)	1-16
A	JP 9-505467 A (イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・アンド・ カンパニー) 1997. 06. 03, & WO 1995/013389 A1 & EP 0728213 A1 & US 5908975 A	1-16
A	JP 2003-180354 A (シンジェンタ パーティシペーションズ アク チエンゲゼルシャフト) 2003. 07. 02, & US 6054637 A & EP 0462065 A2	1-16
A	JP 5-49482 A (インステイトウート フユア ゲンビオロギツシエ フオルシユング ベルリン ゲゼルシャフト ミット ベシユレン クテル ハフツング) 1993. 03. 02, & US 5436394 A & US 5917127 A & EP 0442592 A2	1-16
A	Kang TJ et al., Enhanced expression of B-subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin in tobacco by optimization of coding sequence, Appl. Biochem. Biotechnol., 2004, Vol. 117, No. 3, pp. 175-187	1-16

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2004-506432 A (シンジェンタ・パティシペーションズ・アクチ エンゲゼルシャフト) 2004. 03. 04, & EP 1311162 A2 & WO 2002/015701 A2	1-16
A	JP 2006-515169 A (ユニバーシテイ・オブ・バス) 2006. 05. 25, & US 2004/0103455 A1 & EP 1563072 A2 & WO 2004/044217 A2	1-16
A	WO 2000/075345 A1 (LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG) 2000. 12. 14, & EP 1057895 A1 & EP 1183374 A1	1-16
A	Satoh J et al., The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant, J. Biosci. Bioeng., 2004, Vol. 98, No. 1, pp. 1-8	1-16