

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/073653

発行日 平成27年4月2日 (2015.4.2)

(43) 国際公開日 平成25年5月23日 (2013.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁)

出願番号 特願2013-544335 (P2013-544335)	(71) 出願人 504202472 大学共同利用機関法人情報・システム研究 機構 東京都立川市緑町10番3号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/079744	
(22) 国際出願日 平成24年11月16日 (2012.11.16)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-252147 (P2011-252147)	(71) 出願人 504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(32) 優先日 平成23年11月18日 (2011.11.18)	(74) 代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100077562 弁理士 高野 登志雄
	(74) 代理人 100096736 弁理士 中嶋 俊夫
	(74) 代理人 100117156 弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真核細胞におけるタンパク質分解誘導方法

(57) 【要約】

出芽酵母などの宿主を致死させず、また十分な分解能を有する新たなタンパク質誘導性真核細胞及びそれを用いたタンパク質分解誘導方法を提供する。

植物由来の T I R 1 ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来 A u x / I A A ファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子とを有する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞であって、該部分配列が、A u x / I A A ファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつの L y s 残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物由来の T I R 1 ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来 A u x / I A A ファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子とを有する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞であって、該部分配列が、A u x / I A A ファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのL y s 残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞。

【請求項 2】

前記部分配列が、A u x / I A A ファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのL y s 残基を含む32～80アミノ酸残基からなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列である請求項1記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞。

【請求項 3】

前記部分配列が、配列番号1～12から選ばれる配列を含む50～80アミノ酸残基からなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列である請求項1又は2記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞。

【請求項 4】

宿主非植物真核細胞に、植物由来の T I R 1 ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来 A u x / I A A ファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子を導入する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法であって、該部分配列が、A u x / I A A ファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのL y s 残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法。

【請求項 5】

前記部分配列が、A u x / I A A ファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのL y s 残基を含む32～80アミノ酸残基からなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列である請求項4記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法。

【請求項 6】

前記部分配列が、配列番号1～12から選ばれる配列を含む32～80アミノ酸残基からなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列である請求項4又は5記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法。

【請求項 7】

植物由来の T I R 1 ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来 A u x / I A A ファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子とを有する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクターであって、該部分配列が、A u x / I A A ファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのL y s 残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクター。

【請求項 8】

前記部分配列が、A u x / I A A ファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのL y s 残基を含む32～80アミノ酸残基からなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列である請求項7記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクター。

【請求項 9】

前記部分配列が、配列番号1～12から選ばれる配列を含む32～80アミノ酸残基か

10

20

30

40

50

らなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列である請求項7又は8記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクター。

【請求項10】

請求項1～3のいずれか1項記載の非植物性真核細胞に、オーキシン類を添加することを特徴とする、該非植物真核細胞における目的タンパク質の分解誘導方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は真核細胞において目的タンパク質の分解を効率良く誘導する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞内で特定のタンパク質の発現量をコントロールすることは、細胞内におけるそのタンパク質の機能及びそのタンパク質が関与する生命現象を解析する上において非常に有用である。この目的のために、これまで別個の原理に基づく複数の方法が開発されている。

【0003】

例えば、大腸菌のテトラサイクリン結合性転写抑制因子を利用して、培養細胞内に導入した遺伝子の転写発現をテトラサイクリン依存的に行う方法が知られている（非特許文献1、2）。この原理に基づく転写抑制システムは市販されており、多くの研究者が実際に利用してこれまで成果を上げてきた。しかしながら、この方法は目的遺伝子の転写制御を行う方法であるため、発現抑制を行っても実際のタンパク質が細胞内から除去されるまでに時間がかかる場合が多く、場合によっては、目的タンパク質の部分的発現量低下が二次的な細胞内応答反応を活性化してしまう場合もある。

同様に培養細胞内で発現抑制を行う方法としてsiRNA及びshRNAを細胞内に導入し、細胞内のRNA干渉反応を利用して対象遺伝子産物のmRNAを分解する方法が知られている。実際にこの方法に基づく製品も多く、多くの会社から発売されている。しかし、この方法もmRNAレベルでの発現抑制を行うものであるため、発現抑制まで一般に24～48時間もの時間を必要とする。また発現抑制の度合いも、対象とする因子やターゲットRNA配列に依存しており、90%以上の発現抑制を達成できる可能性はそれほど高くない。

【0004】

最近になり、標的タンパク質に分解誘導タグを導入し、そのタグの分解制御を行うことによりタンパク質の発現を制御する方法が実用化され始めてきた。ラバマイシン結合タンパク質FKBP12を改変したタンパク質は、ラバマイシン類似化合物であるShield1に結合すると安定化され、結合しないと不安定化し細胞内で分解される。この性質を利用して、目的タンパク質にこのFKBP12由来タンパク質を融合して、Shield1依存的に発現制御を行う方法が発表された（非特許文献3）。この方法は一般にShield1除去により標的タンパク質を4時間程度で分解するとされており、必要なプラスミドセット等が発売されている。この方法ではタンパク質を安定発現させるためにはShield1を常に培地に添加する必要があるが、Shield1がラバマイシン類似化合物であるためにその細胞毒性に疑問がある。また、発現抑制に必要な分解時間も4時間程度という点から、細胞周期などの研究にはより素早い分解除去が可能なシステムが望まれてきた。

【0005】

かかる実情から本発明者は、植物ホルモンオーキシンによって誘導される植物特異的なタンパク質分解に着目し、この分解経路を出芽酵母や哺乳類細胞に導入し、オーキシンを培地に添加することで15～30分というごく短時間で目的タンパク質を分解することにより発現抑制する方法を開発した（特許文献1、2）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

10

20

30

40

50

【特許文献1】特開2008-187958号公報

【特許文献2】国際公開第2010/125620号パンフレット

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547-5551, 1992

【非特許文献2】Gossen et al. Science, 268, 1766-1769, 1995

【非特許文献3】Banazynski et al. Cell, 126, 995-1004, 2006

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、前記特許文献1及び2において用いられたタグは、植物Aux/IAAファミリータンパク質であるが、出芽酵母における成育必須の因子にタグを付加すると致死となってしまうことがあること、またこのタグは分解が十分でないためにオーキシンを添加しても表現系がみられない場合もあった。

従って、本発明の課題は、出芽酵母などの宿主を致死させず、また十分な分解能を有する新たなタンパク質誘導性真核細胞及びそれを用いたタンパク質分解誘導方法を提供するものである。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

そこで、本発明者は、タグとして用いるAux/IAAファミリータンパク質の改変を試み、タグのサイズを縮小化すべく、IAAファミリータンパク質の部分配列の利用を検討した。しかしながら、IAAファミリータンパク質のドメインII領域のみを用いても十分な分解能の向上は見られず、一方ドメインIを含む部分配列を用いても分解能の向上はみられなかった。そこでさらに検討を続けたところ、全く意外にもIAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのLys残基を含む領域からなる配列、又はこれを2個以上連結した配列をタグとして用いれば、分解能が飛躍に向上し、かつ宿主を致死させないことを見出し、本発明を完成した。

30

【0010】

すなわち、本発明は、植物由来のTIR1ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子とを有する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞であって、該部分配列が、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのLys残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞を提供するものである。

【0011】

また、本発明は、宿主非植物真核細胞に、植物由来のTIR1ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子を導入する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法であって、該部分配列が、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのLys残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法を提供するものである。

40

【0012】

また、本発明は、植物由来のTIR1ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ

50

遺伝子とを有する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクターであって、該部分配列が、A u x / I A Aファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのL y s残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクターを提供するものである。

【0013】

さらに本発明は、上記のタンパク質分解誘導性の非植物性真核細胞に、オーキシン類を添加することを特徴とする、該非植物真核細胞における目的タンパク質の分解誘導方法を提供するものである。

10

【発明の効果】

【0014】

本発明の真核細胞を用いれば、細胞の致死もなく、オーキシン類の添加により短時間で確実にかつ効率的に目的タンパク質の分解が誘導できることから、所定のタンパク質の機能解析、所定のタンパク質の機能をターゲットにした医薬開発等の分野におけるツールとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】 I A Aファミリータンパク質遺伝子の概略図である。

【図2】 I A Aファミリータンパク質の好ましい部分配列を示す。

20

【図3】 各組換体の分解能を示す図である。

【図4】 各組換体の分解能を示す図である。

【図5】 各組換体の分解能を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明のタンパク質分解誘導性非植物真核細胞は、(1)植物由来のT I R 1ファミリータンパク質遺伝子と、(2)植物由来A u x / I A Aファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子とを有する。このT I R 1ファミリータンパク質遺伝子と、A u x / I A Aファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子との組み合わせは、非植物真核細胞内で植物のユビキチン化酵素複合体に基づく分解経路を形成させたものである。すなわち、動物、植物、菌類等の種々の真核生物において、ユビキチン/プロテアソーム系のタンパク質分解が知られている。この分解システムは、ユビキチン活性化酵素(E 1) - ユビキチン結合酵素(E 2) - ユビキチンリガーゼ(E 3)という3つの酵素によって、ターゲットタンパク質にユビキチンが結合され、ポリユビキチン化されたターゲットタンパク質がプロテアソームによって特異的に認識され、分解されるシステムである。このユビキチンリガーゼとして、E 3ユビキチン化酵素複合体(S C F複合体)が報告されている。このS C F複合体は、F - b o xタンパク質、S k p 1タンパク質、C u l l i n - 1タンパク質及びR b x 1タンパク質という4つのサブユニットから構成されている。植物のS C F複合体について、F - b o xタンパク質としてT I R 1ファミリータンパク質を有し、これが成長ホルモンであるオーキシンの受容体となっており、オーキシンを受容することによって、オーキシン情報伝達系の抑制因子A u x / I A Aファミリータンパク質を認識して、前記タンパク質を分解することが、近年解明された。そこで、本発明者は、オーキシンを誘導物質として、植物由来T I R 1ファミリータンパク質により、A u x / I A Aファミリータンパク質の部分配列を認識させ、A u x / I A Aファミリータンパク質の部分配列で標識化した目的タンパク質を分解する系を、植物以外の真核細胞において機能させることに成功したのである。

30

40

【0017】

本発明のタンパク質分解誘導性非植物細胞であれば、オーキシン類の添加によって、任意の時期に、発現した目的タンパク質を分解できる。つまり、本発明のタンパク質分解誘

50

導性非植物真核細胞によれば、例えば、植物由来TIR1ファミリータンパク質を含むSCF複合体及びAux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化された目的タンパク質が発現する。このため、オーキシン類の共存下であれば、前記SCF複合体の植物由来のTIR1ファミリータンパク質がオーキシン類を受容し、これによってTIR1ファミリータンパク質によるAux/IAAファミリータンパク質の部分配列の認識、ならびに、Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列へのポリユビキチン化が生じる。そして、プロテアソームによって、ポリユビキチン化Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化された目的タンパク質が分解される。このため、例えば、オーキシン類の添加、無添加によって、発現した目的タンパク質の分解を制御することが可能である。

10

【0018】

本発明に用いられるTIR1ファミリータンパク質遺伝子は、植物由来のものである。ここで植物の種類は制限されないが、例えばシロイヌナズナ、イネ、ヒヤクニチソウ、マツ、シダ、ヒメツリガネゴケ等が挙げられる。なお、宿主細胞が哺乳類細胞の場合は、イネが好ましい。当該植物由来のTIR1ファミリータンパク質遺伝子としては、TIR1遺伝子、AFB1遺伝子、AFB2遺伝子、AFB3遺伝子、FBX14遺伝子、AFB5遺伝子が挙げられるが、TIR1遺伝子が特に好ましい。より具体的には、NCBI(National Center for Biotechnology Information)に登録されているアクセッションNo. NM_001059194(GeneID: 4335696)、Os04g0395600もしくは同データベース登録の、

20

【0019】

前記植物由来TIR1ファミリー遺伝子は、例えば、前記の植物、例えばイネ、シロイヌナズナ等から抽出した天然のDNAでもよいし、遺伝子工学によって合成したDNAであってもよい。また、前記TIR1ファミリー遺伝子は、例えば、エキソンとイントロンを含むDNAでもよいし、エキソンからなるcDNAであってもよい。前記TIR1ファミリー遺伝子は、例えば、ゲノムDNAにおける全長配列又はcDNAにおける全長配列であってもよい。また、前記TIR1ファミリー遺伝子は、発現したタンパク質が、TIR1ファミリータンパク質として機能する範囲において、ゲノムDNAにおける部分配列又はcDNAにおける部分配列であってもよい。本発明において、「TIR1ファミリータンパク質として機能する」とは、例えば、オーキシン類の存在下で、Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列を認識することを意味する。植物由来TIR1ファミリータンパク質がAux/IAAファミリータンパク質の部分配列を認識できれば、前述のようにAux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化された目的タンパク質を分解できるからである。この際、本発明のタンパク質分解誘導性非植物真核細胞においては、植物由来TIR1ファミリータンパク質が、他のサブユニット(Skp1タンパク質、Cullinタンパク質及びRbx1タンパク質)とともに、SCF複合体(E3ユビキチン化酵素複合体)を形成していると推測される。

30

【0020】

本発明のタンパク質分解誘導性非植物真核細胞は、前記植物由来TIR1ファミリー遺伝子の転写を制御するプロモーター配列をさらに有することが好ましい。これによって、より確実に植物由来TIR1ファミリータンパク質を発現できる。前記プロモーターは、制限されず、例えば、細胞の種類等に応じて適宜決定できる。

40

【0021】

本発明において、前記キメラ遺伝子は、Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子である。発現した目的タンパク質は、前記Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化されていればよく、その形態は制限されないが、例えば、目的タンパク質とAux/IAAファミリータンパク質の部分配列とを含む融合タンパク質であることが好ましい。Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列は、例えば、目的タンパク質のN末側及びC末側のいずれに付加

50

されてもよい。

【0022】

また、目的遺伝子とAux/IAAファミリー遺伝子の部分配列の位置関係は、制限されず、発現した目的タンパク質が、前記Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化されるように、両遺伝子が機能的に配置されていればよい。具体例として、前記Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列は、前記目的遺伝子の上流（5'側）又は下流（3'側）に隣接して配置されていることが好ましい。目的タンパク質が発現され、Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化される限りにおいて、例えば、目的遺伝子の内部に、前記Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列が介在してもよい。

【0023】

前記Aux/IAAファミリー遺伝子は、植物由来のAux/IAAファミリー遺伝子であれば、その種類は制限されない。前記植物の種類は、制限されないがシロイヌナズナIAA17遺伝子が好ましい。Aux/IAAファミリー遺伝子の具体例としては、例えば、IAA1遺伝子、IAA2遺伝子、IAA3遺伝子、IAA4遺伝子、IAA5遺伝子、IAA6遺伝子、IAA7遺伝子、IAA8遺伝子、IAA9遺伝子、IAA10遺伝子、IAA11遺伝子、IAA12遺伝子、IAA13遺伝子、IAA14遺伝子、IAA15遺伝子、IAA16遺伝子、IAA17遺伝子、IAA18遺伝子、IAA19遺伝子、IAA20遺伝子、IAA26遺伝子、IAA27遺伝子、IAA28遺伝子、IAA29遺伝子、IAA30遺伝子、IAA31遺伝子、IAA32遺伝子、IAA33遺伝子及びIAA34遺伝子等が挙げられる。前記タンパク質分解誘導性非植物真核細胞は、いずれか一種の前記Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列を有していてもよいし、二種類以上を有していてもよい。例えば、シロイヌナズナ由来のAux/IAAファミリー遺伝子の配列は、TAIR (the Arabidopsis Information Resource) に登録されており、各遺伝子のアクセッションナンバーは、次のとおりである。IAA1遺伝子 (AT4G14560)、IAA2遺伝子 (AT3G23030)、IAA3遺伝子 (AT1G04240)、IAA4遺伝子 (AT5G43700)、IAA5遺伝子 (AT1G15580)、IAA6遺伝子 (AT1G52830)、IAA7遺伝子 (AT3G23050)、IAA8遺伝子 (AT2G22670)、IAA9遺伝子 (AT5G65670)、IAA10遺伝子 (AT1G04100)、IAA11遺伝子 (AT4G28640)、IAA12遺伝子 (AT1G04550)、IAA13遺伝子 (AT2G33310)、IAA14遺伝子 (AT4G14550)、IAA15遺伝子 (AT1G80390)、IAA16遺伝子 (AT3G04730)、IAA17遺伝子 (AT1G04250)、IAA18遺伝子 (AT1G51950)、IAA19遺伝子 (AT3G15540)、IAA20遺伝子 (AT2G46990)、IAA26遺伝子 (AT3G16500)、IAA27遺伝子 (AT4G29080)、IAA28遺伝子 (AT5G25890)、IAA29遺伝子 (AT4G32280)、IAA30遺伝子 (AT3G62100)、IAA31遺伝子 (AT3G17600)、IAA32遺伝子 (AT2G01200)、IAA33遺伝子 (AT5G57420) 及びIAA34遺伝子 (AT1G15050)。

【0024】

本発明は、前記Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列として、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に少なくとも2個ずつのLys残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2個以上連結してなる配列を使用する点に特徴がある。このような特定の部分配列を使用することにより、Aux/IAAファミリータンパク質全長やドメインII領域等を使用する場合に比べて、目的タンパク質の分解誘導能が向上し、かつ細胞の死亡が抑制され、安定した目的タンパク質分解誘導性が得られる。

【0025】

Aux/IAAファミリータンパク質は、図1に示すように全長25KDa程度のタンパク質であり、N末端側からドメインI、ドメインII、ドメインIII及びドメインIV等を

10

20

30

40

50

有する。このうち、ドメインIIだけでも目的タンパク質の分解誘導能の向上はみられず、N末端からドメインIIまでの配列でも目的タンパク質の分解誘導能の向上はみられない。これに対し、ドメインIIのN末端側とC末端側に少なくとも2個ずつのLys残基を含む領域であって、ドメインIを含まず、ドメインIIIは一部含んでいてもよい領域からなる配列を使用すれば、目的タンパク質の分解誘導能が顕著に向上する。また、当該配列を2個以上連結した配列を使用すると、目的タンパク質の分解誘導能がさらに向上する。

【0026】

このような部分配列としては、32～80アミノ酸残基が好ましく、50～80アミノ酸残基がより好ましく、50～75アミノ酸残基がさらに好ましく、50～70アミノ酸残基がさらに好ましい。

10

【0027】

前記部分配列としては、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつ、より好ましくは2～4個ずつのLys残基を含む32～80アミノ酸残基からなる配列がより好ましい。

【0028】

ここでIAAファミリータンパク質のうち、IAA17、IAA16、IAA14、IAA9、IAA27、IAA4、IAA1、IAA2、IAA3、IAA8、IAA5及びIAA6の部分配列の例を図2及び配列番号1～12に示す。本発明においては、これらの配列番号から選ばれる配列を含む50～80アミノ酸残基からなる配列がさらに好ましく、50～75アミノ酸残基からなる配列がさらに好ましい。なお、IAA17の全アミノ酸配列を配列番号23に示す。

20

【0029】

また、該配列の連結数は2～5個が好ましく、2～4個がより好ましく、2又は3個がさらに好ましい。

【0030】

本発明のタンパク質分解誘導性非植物真核細胞は、さらに、前記キメラ遺伝子の転写を制御するプロモーター配列を有することが好ましい。これによって、より確実に、前記Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化された目的タンパク質を発現できる。前記プロモーターは、制限されず、例えば、細胞の種類等に応じて適宜決定できる。

【0031】

本発明において、前記目的タンパク質の遺伝子は、非植物真核細胞のゲノムに存在する内在の遺伝子でもよいし、非植物真核細胞に導入された外来の遺伝子であってもよい。また、前記外来遺伝子は、例えば、ゲノムDNAに組み込まれてもよいし、組み込まれていなくてもよい。前者の場合、例えば、外来遺伝子を連結した遺伝子導入ベクター等によって、ゲノムDNA中に組み込まれた状態である。また、後者の場合、例えば、前記遺伝子導入用ベクター等が、プラスミドとして存在している状態であり、前記遺伝子導入用ベクターにおいて、前記目的遺伝子は、複製起点に機能的に連結されていることが好ましい。

30

【0032】

本発明において、宿主細胞は、植物以外（非植物）の真核生物の細胞であればよく、例えば、動物、菌類、原生生物等の細胞が挙げられる。動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ等の哺乳類、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル等の魚類や両生類、C.elegansやショウジョウバエ等の無脊椎動物が挙げられる。また、その細胞の種類も制限されず、例えば、Hela細胞、CHO細胞、MCF、HEK293、HePG2、NIH3T3、COS細胞、DT40等の培養細胞；初代培養細胞；造血幹細胞；B細胞、T細胞、白血球、単球・マクロファージ、赤血球、血小板等の血球系細胞、血液細胞；受精卵母細胞；ES細胞等が挙げられる。また、その他の各種組織細胞等でもよい。また、菌類としては、例えば、出芽酵母、分裂酵母等が挙げられる。

40

【0033】

本発明において、哺乳類細胞を用いる場合は、Skp1遺伝子、Cullin遺伝子、及び、Rbx1遺伝子を有することが好ましい。これらの各遺伝子は、哺乳類細胞の内在

50

遺伝子であることが好ましい。本発明のタンパク質分解誘導性哺乳類細胞では、これらの遺伝子から発現したタンパク質（すなわち、Skp1タンパク質、Cullinタンパク質及びRbx1タンパク質）と、イネ由来TIR1ファミリー遺伝子から発現したTIR1ファミリータンパク質とから、SCF複合体が構成されると推測される。

【0034】

本発明のタンパク質分解誘導性非植物真核細胞の製造方法は、例えば（１）宿主である真核細胞に、植物由来TIR1ファミリー遺伝子を導入する工程、（２）宿主である真核細胞に、植物由来Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列を導入し、前記Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子を形成する工程によって行うことができる。

10

【0035】

本発明において、前記工程（１）及び工程（２）の順序は制限されず、同時に行ってもよい。前記工程（１）における植物由来ファミリー遺伝子の導入と、前記工程（２）におけるAux/IAAファミリー遺伝子の部分配列の導入とは、例えば、それぞれ別個のベクターを用いて行ってもよいが、前記植物由来ファミリー遺伝子及び前記Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列が挿入された一つのベクターを用いて行うのが好ましい。

【0036】

本発明において、目的遺伝子は、前述のように、真核細胞のゲノムDNAに存在する内在遺伝子でもよいし、外来遺伝子であってもよい。前記内在遺伝子の場合、前記工程（２）において、例えば、Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列を哺乳類細胞に導入し、内在の目的遺伝子に機能的に連結させることによってキメラ遺伝子を形成できる。また、Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列と目的遺伝子とを連結させたキメラ遺伝子を形成し、これを真核細胞に導入し、ゲノムとの組換えによりキメラ遺伝子をゲノムに挿入してもよい。

20

【0037】

目的遺伝子が外来遺伝子の場合、例えば、Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列の導入に先立って、外来遺伝子を前記真核細胞に導入してもよい。また、目的遺伝子が外来遺伝子の場合、例えば、Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列とともに、真核細胞に導入してもよい。具体的には、予め、Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列と目的タンパク質の遺伝子とが機能的に連結したキメラ遺伝子を作製し、これを真核細胞に導入することもできる。

30

【0038】

目的遺伝子が外来遺伝子であり、ベクターを用いた組換えによって、TIR1ファミリー遺伝子とキメラ遺伝子とを導入する例について説明する。

【0039】

まず、植物由来TIR1遺伝子をベクターに組み込み、TIR1遺伝子導入用ベクターを作製する。ベクターの種類は、制限されず、例えば、真核細胞の種類等に応じて適宜決定できる。具体例として、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。前記プラスミドベクターとしては、例えば、pCMV、pcDNA、pACT等が挙げられ、前記ウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルス発現系等が挙げられる。

40

【0040】

TIR1遺伝子導入用ベクターは、前記TIR1ファミリー遺伝子の転写を制御するプロモーター配列を有することが好ましい。前記プロモーターとしては、制限されず、例えば、真核細胞の種類等に応じて適宜決定できる。具体例としては、例えば、CMVプロモーター、SV40プロモーター、GAL4結合配列等が挙げられる。前記プロモーターは、通常、TIR1ファミリー遺伝子の上流（5'側）に機能的に連結することが好ましい。さらに、細胞種特異的、器官特異的プロモーターでもよい。また、プロモーター配列をもたないTIR1ファミリー遺伝子を、例えば、宿主細胞や宿主動物個体における内在プロモーターの下流に組み込んでよい。この場合、TIR1ファミリー遺伝子を、例えば

50

、特定遺伝子にターゲティングしてもよいし、ランダムに組み込んでもよい。

【0041】

また、真核細胞への導入の有無を確認できることから、TIR1遺伝子導入用ベクターは、さらに、選択マーカークード配列を有してもよい。前記選択マーカークード配列としては、制限されず、公知の薬剤耐性マーカークード配列が挙げられる。前記薬剤耐性マーカークード配列としては、制限されず、例えば、ネオマイシン耐性マーカークード配列、ピューロマイシン耐性マーカークード配列、ハイグロマイシン耐性マーカークード配列等が挙げられる。前記蛍光タンパク質マーカークード配列としては、例えば、GFP (Green Fluorescent Protein)、EGFP (変異型 GFP: Enhanced GFP) 等が挙げられる。また、酵素マーカークード配列としては、例えば、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等が挙げられる。これらの選択マーカークード配列は、その配列にしたがってPCR等により合成してもよいし、前記選択マーカークード配列を有する市販のベクターから調製することもできる。なお、TIR1遺伝子導入用ベクターと後述するキメラ遺伝子導入用ベクターとを併用する場合、前記TIR1遺伝子導入用ベクターにおける選択マーカークード配列と、キメラ遺伝子導入用ベクターにおける選択マーカークード配列は、異なるマーカークード配列であることが好ましい。さらに、TIR1ファミリー遺伝子は、例えば、他のタンパク質遺伝子又はタグ配列と機能的に連結させ、前記タンパク質とTIR1タンパク質とを含むタンパク質 (例えば、融合タンパク質) として、また、タグで標識化されたTIR1タンパク質として、発現させてもよい。

10

20

【0042】

他方、目的遺伝子及び植物由来Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列をベクターに連結して、キメラ遺伝子の導入用ベクターを作製する。キメラ遺伝子とは、前述のように、Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識化された目的タンパク質を発現する遺伝子である。前記ベクターにおいて、前記目的遺伝子とAux/IAAファミリー遺伝子の部分配列との位置は、制限されず、前述のように、標識化タンパク質を発現できる関係であればよい。具体例として、前記Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列は、前記目的遺伝子の上流 (5'側) 又は下流 (3'側) に隣接して配置されてもよく、目的遺伝子の内部に、Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列が介在してもよい。

【0043】

前記ベクターとしては、制限されず、前述と同様のものが挙げられる。また、キメラ遺伝子導入用ベクターは、前記キメラ遺伝子の転写を制御するプロモーター配列を有することが好ましい。前記プロモーターとしては、前述のようなものが挙げられる。また、真核細胞への導入の有無を確認できることから、キメラ遺伝子導入用ベクターは、さらに、前述のような選択マーカークード配列を有してもよい。

30

【0044】

そして、宿主細胞である真核細胞に、前記のTIR1遺伝子導入用ベクター、ならびに、キメラ遺伝子導入用ベクターを導入する (工程 (1) 及び工程 (2))。前記両ベクターの導入順序は、制限されない。

【0045】

ベクターの導入方法は、特に制限されず、例えば、使用するベクターの種類や宿主細胞の種類等に応じて、適宜決定できる。導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、DEAEデキストラントランスフェクション法、エレクトロポレーション法が挙げられ、この他にも、レトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター等を用いた方法が挙げられる。

40

【0046】

本発明においては、TIR1遺伝子とキメラ遺伝子とが挿入された発現ベクターを用いるのが、効率的である。具体的には、ウイルス由来のプロモーターとIRES (mRNA内部のリボソーム結合サイト) を有するベクターに、これらの遺伝子を挿入して使用するのが好ましい。通常このようなpIRESベクターは、ウイルス由来のプロモーターとIRESの間に発現させようとする目的遺伝子を挿入して使用するように設計されている。

50

しかし、本発明者は、ウイルス由来のプロモーターとIRESとの間にイネ由来のTIR1ファミリー遺伝子を連結し、その下流に前記キメラ遺伝子を連結してなる発現ベクターを作製することにより、効率良く、かつ迅速に目的タンパク質の分解が誘導されることを見出した（国際公開第2010/125620号パンフレット参照）。この発現ベクターのプロモーターとしてはCMVプロモーター、SV40プロモーター等が挙げられるが、CMVプロモーターが好ましい。

【0047】

また、目的遺伝子がゲノムDNA内に存在する場合、例えば、目的遺伝子が真核細胞の内在遺伝子である場合や、目的遺伝子が外来遺伝子であるが、すでに真核細胞のゲノムDNAに組み込まれている場合は、次のようにして製造できる。この場合、キメラ遺伝子導入用ベクターに代えて、Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列を挿入したAux/IAAファミリー遺伝子導入用ベクターを使用する。この遺伝子導入用ベクターは、例えば、真核細胞のゲノムDNAに対して、タンパク質発現の際、Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で目的タンパク質を標識化できる部位に、Aux/IAAファミリー遺伝子の部分配列が組み込まれる構造であることが好ましい。つまり、前記遺伝子導入用ベクターの構造は、ゲノムDNAとの組換えによって、ゲノムDNA内の目的遺伝子とAux/IAAファミリー遺伝子の部分配列とが機能的連結して、キメラ遺伝子を形成するものであればよい。このようにAux/IAAファミリーの部分配列が組み込まれることによって、Aux/IAAファミリーの部分配列で標識化された目的タンパク質を発現できる。なお、キメラ遺伝子導入用ベクターは、例えば、ゲノムDNAにおける目的遺伝子の遺伝子座やその配列等から、当業者であれば構築可能である。

10

20

【0048】

本発明のタンパク質分解誘導性真核細胞にオーキシン類を作用させれば、目的タンパク質の分解が誘導される。その目的タンパク質の分解は、確実でありかつ極めて速やかである。例えば、15～30分でほぼ完全に分解される。

【0049】

目的タンパク質の分解誘導において、オーキシン類の添加量は、制限されず、例えば、オーキシン類の種類に応じて適宜決定できる。具体例としては、 $1\ \mu\text{M}$ ～ $1\ \text{mM}$ であり、好ましくは $20\ \mu\text{M}$ ～ $500\ \mu\text{M}$ 培地に添加する。

【0050】

オーキシンとしては、例えば、1-ナフタレン酢酸(NAA)、インドール-3-酢酸等が挙げられる。また、この他にも、前記NAA等と同様の生理活性を有する化合物群が挙げられ、例えば、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、4-クロロフェノキシ酢酸、(2,4,5-トリクロロフェノキシ)酢酸、1-ナフタレンアセトアミド、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、4-パラクロロ酢酸等がある。例えば、代謝によってオーキシンの生理活性を有することとなる前駆体も使用できる。例えば、宿主細胞におけるエステラーゼや酸化酵素によりオーキシン活性を有する物質に変換される物質が好ましい。具体例としては、例えば、インドール-3-酢酸メチルエステルやインドール-3-酪酸等が挙げられる。

30

【0051】

オーキシン類の添加は、前記細胞を含有する培地に対して行えばよい。

40

【0052】

このように、オーキシン類の添加により目的タンパク質の分解が速やかに誘導できるので、オーキシン類を添加しない場合と対比することにより、目的タンパク質の影響を検討することができる。より具体的には、前記細胞にオーキシン類を添加して、発現した目的タンパク質の分解を誘導した後、前記オーキシン類を除去して、新たに発現した目的タンパク質の分解を抑制する方法；前記細胞にオーキシン類を添加して、発現した目的タンパク質の分解を誘導した後、オーキシン阻害物質を添加して、新たに発現した目的タンパク質の分解を抑制する方法等によって検討することができる。

【実施例】

50

【0053】

次に、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は下記の実施例により制限されない。

【0054】

参考例 1

1. 出芽酵母株の作製

分解目的のタンパク質をEGFPとし、NAA添加によってEGFPを分解する出芽酵母株を作製した。なお、使用した出芽酵母のプロモーター配列や遺伝子配列は、SGDウェブサイト <http://www.yeastgenome.org/> に登録されている。

10

【0055】

(1) シロイヌナズナTIR1発現酵母株(YNK2)

pRS306-GALプラスミドベクターをSalI及びXhoIで切断し、セルフライゲーションさせた。pRS306-GALプラスミドベクターは、文献(L. Drury, G. Perkins and J. Diffley "The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast" EMBO J 16, 5966-5976, 1997)に開示されている。これにより、前記プラスミドベクターのマルチクロニングサイトにあるSalIサイトを除去した。シロイヌナズナのTIR1遺伝子(TAIR accession No. AT1G04250.1)を、下記プライマーセット1を用いたPCRで増幅し(1785bp)、この増幅物を、前記プラスミドベクターのSpeI-NotIサイトにクロニングした。得られたベクターを、pMK26という。

20

<プライマーセット1>

Fプライマー7(配列番号13)

5' - AGCTAGACTAGTATGCGAGAAGCGAATAGCCTT - 3'

Rプライマー8(配列番号14)

5' - ATCGATGCGGCCGCGCAGATCTGCTAGTCGACTAATCCGTTAGTAGTAATGA - 3'

【0056】

pYM18プラスミドベクターからSalI-BglII断片を切断して、9Mycタグ部分(435bp)を切り出し、これを、前記ベクターpMK26のSalI-BglIIサイトにクロニングした。pYM18プラスミドベクターは、文献(C. Janke, M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel, and M. Knop. "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." Yeast 21, 974-962, 2004)に開示されている。得られたベクターをpMK27という。このベクターpMK27を、URA3マーカ内部にあるStuIで切断して、出芽酵母野生株W303-1aにトランスフォーメーションし、相同組換えによって、前記プラスミドベクターを出芽酵母ゲノム上のURA3部位に挿入した。得られた組換え体を、シロイヌナズナTIR1発現株「YNK2」とした。なお、YNK2において、TIR1遺伝子の上流には、ベクター由来のGAL1-10プロモーターが配置されている。

30

40

【0057】

野生株W303-1a及びYNK2の遺伝型を以下に示す。

W303-1a

MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100

50

Y N K 2

M A T a a d e 2 - 1 h i s 3 - 1 1 , 1 5 t r p 1 - 1 l e u 2 - 3 , 1 1 2
 c a n 1 - 1 0 0
 u r a 3 - 1 : U R A 3 - G A L 1 - 1 0 p r o m o t e r - シロイヌナズナ T I R 1
 (p M K 2 7 i n t e g r a t e d)

【 0 0 5 8 】

イネ T I R 1 発現酵母株作製法

イネ T I R 1 遺伝子 (N C B I、アクセッション No. NM_001059194) は
 下記のプライマーセット 2 でイネ c D N A ライブラリーより P C R 増幅した。増幅した産
 物は p M K 2 6 を S p e I と S a l I で処理してシロイヌナズナ T I R 1 遺伝子を取り除
 いた部分にクローニングした。

10

< プライマーセット 2 >

F プライマー

5 ' - G G G G A T C C A T G A C G T A C T T C C C G G A G G A G G T - 3 (配列番
 号 1 5)

R プライマー

5 ' - C C C G T C G A C T A G G A T T T T A A C A A A A T T T G G T G - 3 ' (配
 列番号 1 6)

シロイヌナズナ T I R 1 を導入した際と同様の手法で出芽酵母にイネ T I R 1 を導入し
 た。

20

【 0 0 5 9 】

< イネ T I R 1 発現酵母株の遺伝型 >

M A T a a d e 2 - 1 h i s 3 - 1 1 , 1 5 t r p 1 - 1 l e u 2 - 3 , 1 1 2
 c a n 1 - 1 0 0 u r a 3 - 1 : U R A 3 - G A L 1 - 1 0 p r o m o t e r - イ
 ネ T I R 1

【 0 0 6 0 】

参考例 2

1. 出芽酵母株の作製

(1) 内在性蛋白質 M c m 4 の A u x i n d e g r o n (m c m 4 - a d) 株

内在性タンパク質 M c m 4 を分解目的タンパク質とし、N A A 添加によりこれを分解す
 る株を作製した。内在性タンパク質 M c m 4 は、D N A 複製に關与する必須タンパク質で
 ある。N a t u r e M e t h o d s , V o l . 6 , N o . 1 2 , p 9 1 7 (D e c . 2
 0 0 9) に記載の P M K 4 3 を、下記プライマーセット 3 を用いて P C R により増幅した
 。そして、得られた増幅物を用いて、直接、前記参考例 1 (1) で得られた T I R 1 発現
 株 Y N K 2 にトランスフォーメーションし、相同組換えによって、出芽酵母ゲノム上の M
 C M 4 5 ' 部分に、C U P 1 プロモーター - I A A 1 7 を導入した。この組換え体を、
 「 Y N K 1 4 」という。なお、ゲノムへの挿入は P C R により確認した。

30

【 0 0 6 1 】

< プライマーセット 3 >

F プライマー 1 8 0 (配列番号 1 7)

5 ' - T T G T C C T T G G C G A G G G T G T A A G G A G A T C A G T T C G C C T G A A T A A C C G T G T C C G T A C G C T G C A G G T C G A C - 3 ' ,

40

R プライマー 1 8 1 (配列番号 1 8)

5 ' - T C A A T C G A G C C T A C A T A C A G T A T T G A A T A G T G T T A C A A A G C A T A A G G A T G A T C G A T G A A T T C G A G C T C G - 3

【 0 0 6 2 】

Y N K 1 4 の遺伝型を以下に示す。

Y N K 1 4

M A T a a d e 2 - 1 h i s 3 - 1 1 , 1 5 t r p 1 - 1 l e u 2 - 3 , 1 1 2
 c a n 1 - 1 0 0
 u r a 3 - 1 : U R A 3 - G A L 1 - 1 0 p r o m o t e r - シロイヌナズナ T I R 1

50

(p M K 2 7 i n t e g r a t e d)
 m c m 4 : m c m 4 - a d (k a n M X)
 【 0 0 6 3 】

2. 出芽酵母株の生育実験

Y N K 4 株を、N A A 未添加の Y P D C u 寒天培地 (2 % ペプトン、1 % 酵母粉末、2 % グルコース、0 . 1 m M C u S O ₄、2 % 寒天) 及び、N A A 添加の Y P G N A A 寒天培地 (2 % ペプトン、1 % 酵母粉末、2 % ガラクトース、0 . 1 m M N A A、2 % 寒天) に、プレート 1 枚あたりの細胞数が所定の数 (5 × 1 0 ⁵、5 × 1 0 ⁴、5 × 1 0 ³、5 × 1 0 ²、5 × 1 0 個) となるようにスポットし、2 4 ℃ で 2 日間培養した。そして、細胞の生育を観察した。

10

【 0 0 6 4 】

実施例 1

参考例 2 において、I A A 1 7 の全長タグ (1 - 2 2 9) (配列番号 2 3) に代えて、I A A 1 7 (1 - 1 3 2)、I A A 1 7 (1 - 3 4)、I A A 1 7 (ドメイン II)、I A A 1 7 (1 2 8 - 1 3 2) 及び I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) (配列番号 1) を導入した組換え体を作製した。

得られた組換え体を、参考例 2 (2) と同様にして、オーキシン未添加及びオーキシン添加の場合のタンパク質の分解誘導能 (細胞の成育性) を観察した。

【 0 0 6 5 】

これらの結果を図 3 に示す。同図は、2 4 ℃ における培養結果であり、各株について、左から、スポットした細胞数が 5 × 1 0 ⁵、5 × 1 0 ⁴、5 × 1 0 ³、5 × 1 0 ²、5 × 1 0 個である。また、図中の左側の図は、オーキシン未添加、中央の図はオーキシン添加の場合の細胞の成育像である。右側は、キメラ遺伝子の設計概略図である。

20

【 0 0 6 6 】

図 3 から、I A A 1 7 の全長を分解タグにした場合に比べて、I A A 1 7 (1 - 9 4) や I A A 1 7 (ドメイン II) では、分解能が明らかに低下した。一方、I A A 1 7 (1 - 1 3 2)、I A A 1 7 (2 8 - 1 3 2) 及び I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) では、I A A 1 7 全長と同等又はそれ以上の分解能がみられ、その中では I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) は、一番短い I A A 1 7 の一部をコードしている。

【 0 0 6 7 】

実施例 2

出芽酵母の染色体複製に關与する P s f 2 の C 末端に、全長の I A A 1 7 もしくは I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) を付加した。付加するためには、下記プライマーセットを用いて全長 I A A 付加には p M K 4 3、I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) 付加には p M K 4 3 と同様の配列をもつが、全長 I A A 1 7 部分が I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) に改変されている p M K 6 8 を鋳型として P C R により D N A 増幅を行った。

【 0 0 6 8 】

5 ' - CAGCATCTCTTACCGCTGGTACTGAAAATGATGAAGAAGAATTCAATATTCGTACGCTGCAGGTCGAC - 3 ' (配列番号 1 9)

5 ' - AAATACATTCTATGCCATTAAGTACTAGGATACCACAACAAGTACATATATAATCGATGAATTCGAGCTCG - 3 ' (配列番号 2 0)

40

【 0 0 6 9 】

得られた D N A を精製した後、Y N K 2 株にトランスフォーメーションし、相同組換えにより P S F 2 遺伝子の下流に目的の D N A を挿入した。ゲノムへの挿入は P C R により確認を行った。

しかしながら、全長 I A A 1 7 を持つ株は作成することができなかった。このことはタグ付加が致死性を引き起こす可能性を示している。一方、同様の方法で I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) の付加は問題無く行うことができた。また、得られた P s d 2 - I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) を発現する株はプレート 1 枚あたりの細胞数が所定の数 (5 × 1 0 ⁵、5 × 1 0 ⁴、5 × 1 0 ³、5 × 1 0 ²、5 × 1 0 個) となるようにスポットし、2 4 ℃ で 2 日

50

間培養した。そして、細胞の成育を観察した。その結果、P s d 2 - I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) を発現する株はN A A を添加した培地では成育することができなかった (図 4 、 + a u x i n) 。このことは、細胞内でP s f 2 - I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) が分解されていることを示している。

【 0 0 7 0 】

実施例 3

複数連結した I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) がより機能するかどうか試すために、出芽酵母の染色体複製に関与する S l d 3 の C 末端に図 5 に示す様々な改変型 I A A 1 7 を付加した。付加には下記のプライマーを用いて、全長 I A A 付加には p M K 4 3 、 I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) 付加には p M K 6 8 、複数個の I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) 付加には p M K 4 3 と同様であるが全長 I A A 1 7 部分に 2 × I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) をもつ p M K 7 4 、 3 × I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) をもつ p M K 7 7 を鋳型として用いた。

【 0 0 7 1 】

5 ' - ATAGCTCAAAAAGGAGAGTAAGAAGACGTTTATTTGCTCCAGAATCCACACGTACGCTGCAGGTCGAC - 3 ' (配列番号 2 1)

5 ' - TTTAATTGTATACTCAAAGGCCCCCGAAGTGCGAAATTGTTGTAGCTTAGATCGATGAATTCGAGCTCG - 3 ' (配列番号 2 2)

【 0 0 7 2 】

得られた D N A を精製した後、Y N K 2 株にトランスフォーメーションし、相同組換えにより S L D 2 遺伝子の下流に目的の D N A を挿入した。ゲノムへの挿入は P C R により確認を行った。

【 0 0 7 3 】

得られた株を、N A A を含む培地 (+ a u x i n) もしくは N A A を含まない培地 (- a u x i n) においてプレート 1 枚あたりの細胞数が所定の数 (5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10 個) となるようにスポットし、2 4 で 2 日間培養した。そして、細胞の成育を観察した。

【 0 0 7 4 】

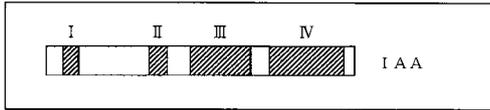
その結果、図 5 に示すように、全長 I A A 1 7 ならびに I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) を付加した株は弱い生育阻害しか観察されなかった。このことは、細胞内において、S l d 2 - I A A 1 7 ならびに S l d 2 - I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) の分解が十分に効率的ではないことを示している。一方、2 × I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2)、3 × I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) を付加した場合、その数の増加に応じて生育阻害が強くなることが明らかになった。このことは、複数個の I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) がもとの全長 I A A 1 7 や I A A 1 7 (6 5 - 1 3 2) よりも分解効率が高いということを示している。

10

20

30

【 図 1 】



【 図 2 】

IAA17
 KEKSACPKDPAKPPAKAQVVGWPPVRSYRKNVMVSCQKSSGGPEAAAFVK
 VSMGAPYLKIDLRMYK

IAA16
 KVDLENMKEKVVKPPAKAQVVGWPPVRSFRKNVMMSGQKPTTGDATEGNDK
 TSGSSGATSSASACATVAYVKVSMGAPYLKIDLKLYK

IAA14
 KEKTFKDPSPKPPAKAQVVGWPPVRYRKNVMANQKSGEAEEMSSGGT
 VAFVKVSMGAPYLKVDLKYK

IAA9
 KKDVPQNIKPGQSSTTNSSSPPAAKQIVGWPPVRSYRKNLATTCKNS
 DEVDGRPGSGALFVKVSMGAPYLKVDLRSYK

IAA27
 KDGKSTFTTKPAVPVKEKSSATAPASKAQVVGWPPVRSFRKNMSMASSQS
 QKPGNNSETEEAEAKSGPEQPCLYVKVSMGAPYLKIDLKTYK

IAA4
 KEIESTGKTETASPPKQIVGWPPVRSYRKNVGTCKSESEGGNYVKVS
 MDGAPYLKIDLTYK

IAA1
 KRKNNDSTEEASPPAKTQIVGWPPVRSNRKNNNNKNVSVYKVSMDGAPY
 LKIDLKMYK

IAA2
 KKEEQEVSCVKSNNKRLFEETRDEEESTPPTKTQIVGWPPVRSRKNNT
 SVSYVKVSMGAPYLKIDLKTYK

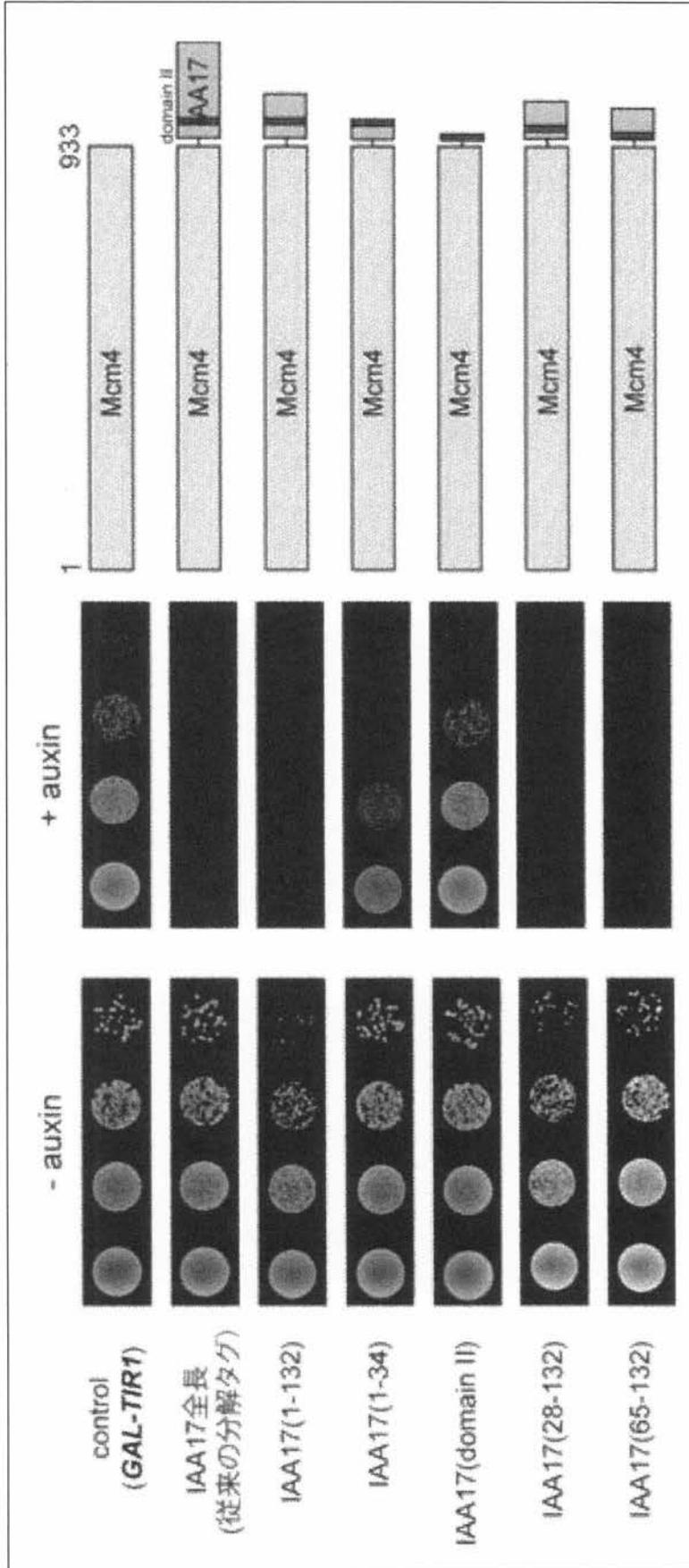
IAA3
 TEKEIESSSRKTETSPRKAQIVGWPPVRSYRKNNIQSKKNESEHEGGI
 YVKVSMGAPYLKIDLSCYK

IAA8
 KVKDVLKDERSHAKGGGLNNAKQVVGWPPVRSYRKNMASSTSKNT
 DEVDGKPLGALFVKVSMGAPYLKVDLRTYK

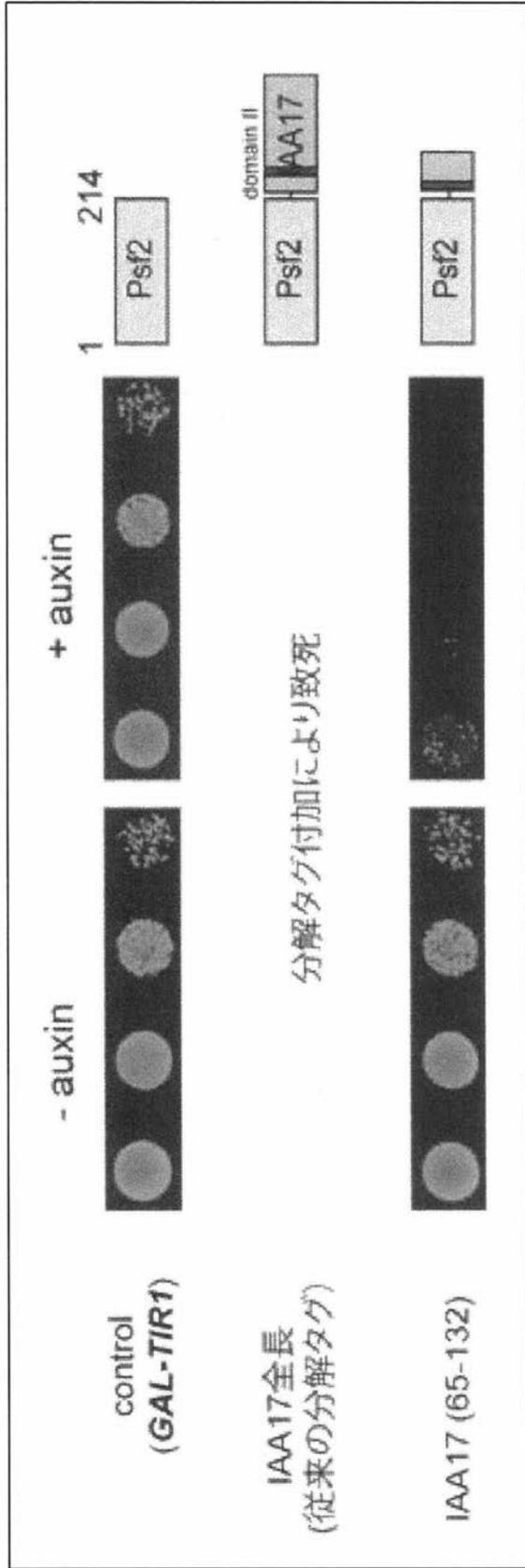
IAA5
 KKRASPEVEIDLKCEPAKKSQVVGWPPVCSYRRKNSLERTKSSYVKVSD
 GAAFLRKIDLEMYK

IAA6
 SALDTENENSVSVEDESLPVVKSQAVGWPPVCSYRRKKNNEEASKAIG
 YVKVSMGVPYMRK

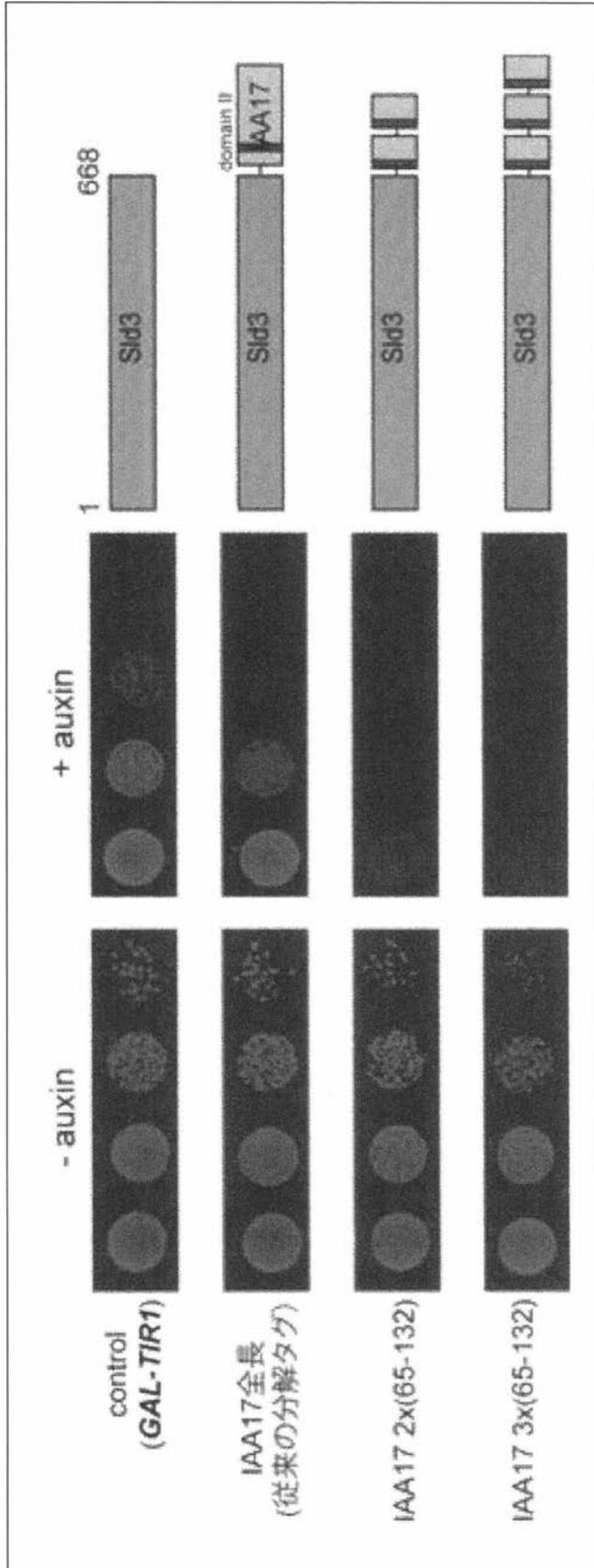
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2013073653000001.app

【 手続補正書 】

【提出日】平成25年4月25日(2013.4.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物由来のTIR1ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子とを有する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞であって、該部分配列が、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのLys残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞。

【請求項2】

前記部分配列が、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのLys残基を含む領域からなる配列を2～4個連結してなる配列である請求項1記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞。

【請求項3】

前記部分配列が、配列番号1～12から選ばれる配列を2～4個連結してなる配列である請求項1又は2記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞。

【請求項4】

宿主非植物真核細胞に、植物由来のTIR1ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子を導入する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法であって、該部分配列が、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのLys残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法。

【請求項5】

前記部分配列が、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのLys残基を含む領域からなる配列を2～4個連結してなる配列である請求項4記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法。

【請求項6】

前記部分配列が、配列番号1～12から選ばれる配列を2～4個連結してなる配列である請求項4又は5記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞の製造法。

【請求項7】

植物由来のTIR1ファミリータンパク質遺伝子と、植物由来Aux/IAAファミリータンパク質の部分配列で標識された目的タンパク質を発現するキメラ遺伝子とを有する、オーキシン類により目的タンパク質の分解が誘導されるタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクターであって、該部分配列が、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのLys残基を含む領域からなる配列、又は該配列を2～4個連結してなる配列であることを特徴とするタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクター。

【請求項8】

前記部分配列が、Aux/IAAファミリータンパク質のドメインII領域のN末端側及びC末端側に2～5個ずつのLys残基を含む領域からなる配列を2～4個連結してなる配列である請求項7記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクター。

【請求項 9】

前記部分配列が、配列番号 1 ~ 12 から選ばれる配列を 2 ~ 4 個連結してなる配列である請求項 7 又は 8 記載のタンパク質分解誘導性の非植物真核細胞用の遺伝子導入用ベクター。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の非植物性真核細胞に、オーキシン類を添加することを特徴とする、該非植物真核細胞における目的タンパク質の分解誘導方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/079744
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i</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, C12N1/15, C12N1/19, C12N5/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed,		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-187958 A (Osaka University), 21 August 2008 (21.08.2008), claims; paragraphs [0025] to [0027]; examples 1 to 3 (Family: none)	1-10
Y	JP 2003-534775 A (Vertex Pharmaceuticals Inc.), 25 November 2003 (25.11.2003), paragraphs [0011], [0067] to [0077], [0119], [0120], [0131], [0132]; examples & US 7262005 B1 & EP 1255853 A	1-10
A	DREHER KA et al., The Arabidopsis Aux/IAA Protein Family Has Diversified in Degradation and Auxin Responsiveness, The Plant Cell, 2006, Vol.18, p.699-714	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 28 January, 2013 (28.01.13)		Date of mailing of the international search report 05 February, 2013 (05.02.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/079744

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6222095 B1 (Judy Callis, Cathy K. Worley), 24 April 2001 (24.04.2001), fig. 1 to 3; claims; SEQ ID NO:5 (Family: none)	1-10
A	WO 2010/125620 A1 (Osaka University), 04 November 2010 (04.11.2010), claims; examples (Family: none)	1-10
A	CHU BW et al., Recent Progress with FKBP- derived destabilizing domains, Bioorg Med Chem Lett., 2008, Vol.18, p.5941-5944	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/079744

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

Science Direct, WPI

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2012/079744									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(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 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2013年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2013年	日本国実用新案登録公報	1996-2013年	日本国登録実用新案公報	1994-2013年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2013年										
日本国実用新案登録公報	1996-2013年										
日本国登録実用新案公報	1994-2013年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, Science Direct, WPI											
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 請求項の番号									
Y	JP 2008-187958 A (国立大学法人大阪大学) 2008.08.21, 特許請求の範囲、【0025】～【0027】、実施例1-3 (ファミリーなし)	1-10									
Y	JP 2003-534775 A (パーテックス ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 2003.11.25, 【0011】、【0067】-【0077】、【0119】、【0120】、【0131】、【0132】、実施例 & US 7262005 B1 & EP 1255853 A	1-10									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 28.01.2013		国際調査報告の発送日 05.02.2013									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 北田 祐介	4N 4868								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/079744

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 請求項の番号
A	DREHER KA et al., The Arabidopsis Aux/IAA Protein Family Has Diversified in Degradation and Auxin Responsiveness, The Plant Cell, 2006, Vol.18, p.699-714	1-10
A	US 6222095 B1 (Judy Callis, Cathy K. Worley) 2001.04.24, Fig.1-3, CLAIMS、SEQ ID NO:5 (ファミリーなし)	1-10
A	WO 2010/125620 A1 (国立大学法人大阪大学) 2010.11.04, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-10
A	CHU BW et al., Recent Progress with FKBP-derived destabilizing domains, Bioorg Med Chem Lett., 2008, Vol.18, p.5941-5944	1-10

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2009年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 鐘巻 将人

静岡県三島市谷田 1 1 1 1 国立遺伝学研究所内

(72)発明者 西村 浩平

静岡県三島市谷田 1 1 1 1 国立遺伝学研究所内

(72)発明者 滝澤 温彦

大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 三村 覚

大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 小畑 有以

大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA04 CA07 DA12 EA04 FA02 GA11

4B065 AA57X AA72X AA83X AA88Y AA90X AB01 BA02 BB35 CA60

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。