

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-519607

(P2005-519607A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00	A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 B O 3 0
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-574823 (P2003-574823)
 (86) (22) 出願日 平成15年3月12日 (2003. 3. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月22日 (2004. 10. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2003/000292
 (87) 国際公開番号 W02003/076619
 (87) 国際公開日 平成15年9月18日 (2003. 9. 18)
 (31) 優先権主張番号 60/363, 851
 (32) 優先日 平成14年3月14日 (2002. 3. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591269435
 コモンウェルス サイエнтиフィック
 アンド インダストリアル リサーチ オ
 ーガニゼーション
 COMMONWEALTH SCIENT
 IFIC AND INDUSTRIAL
 RESEARCH ORGANIZAT
 ION
 オーストラリア国 2601 オーストラ
 リアン キャピタル テリトリー キャン
 ベル ライムストーン アベニュー 番地
 なし
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変された遺伝子サイレンシングRNAおよびその使用

(57) 【要約】

真核細胞および生物において対象となる遺伝子の発現を効率的にダウンレギュレーションするための方法および手段を提供する。そのために、本発明は、改変されたアンチセンスおよびセンスRNA分子、前記改変されたアンチセンスまたはセンスRNA分子をコードするキメラ遺伝子、ならびに前記改変されたアンチセンスおよび/またはセンスRNA分子あるいはそれをコードするキメラ遺伝子を含む、植物、動物、真菌、酵母または糸状菌のような真核生物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

真核生物の細胞における標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするための方法であって、以下のステップ：

a) 真核生物の細胞にキメラRNA分子を供給すること、ここにおいて、前記キメラRNA分子は、

i) 標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む標的遺伝子特異的RNA領域と、これに機能的に連結された

ii) 大部分が二本鎖のRNA領域、

を含むものであること、

b) 標的遺伝子の発現がダウンレギュレーションされている真核生物を同定すること、を含んでなる上記方法。

10

【請求項2】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス(PSTVd)型のウイルス由来の核局在化シグナルを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

核局在化シグナルが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス、カンキツウイルス種III、カンキツウイルス種IV、ホップ潜在ウイルス、オーストラリアブドウウイルス、トマトプラントマチュウイルス、ココヤシチナンガヤウイルス、トマト頂端矮化ウイルス、ココヤシカダンク-カダンクウイルス、カンキツエクソコーティスウイルス、コルムネア潜在ウイルス、ホップ矮化ウイルス、およびカンキツベントリーフウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、請求項2に記載の方法。

20

【請求項4】

前記ウイルスが配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択されるゲノムヌクレオチド配列を有する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルチューバーウイルス由来である、請求項2~4のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項6】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルウイルスRG1株由来である、請求項2~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

核局在化シグナルが、配列番号3のヌクレオチド配列から選択される核局在化シグナルとして機能するヌクレオチド配列を含む、請求項2~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

大部分が二本鎖のRNAが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IIIのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IVのゲノムヌクレオチド配列、ホップ潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、オーストラリアブドウウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマトプラントマチュウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシチナンガヤウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマト頂端矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシカダンク-カダンクウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツエクソコーティスウイルスのゲノムヌクレオチド配列、コルムネア潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ホップ矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、およびカンキツベントリーフウイルスのゲノムヌクレオチド配列からなる群より選択されるウイルスゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項2または3に記載の方法。

40

【請求項9】

50

ウイルスゲノムヌクレオチド配列が配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項2～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

ウイルスゲノムヌクレオチド配列がジャガイモスピンドルチューバーウイルスRG1株のゲノムヌクレオチド配列である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記ゲノムヌクレオチド配列が配列番号3のヌクレオチド配列を有する、請求項11に記載の方法。 10

【請求項13】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの少なくとも35回の繰返しを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの44～2000回の繰返しを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記RNA分子が複数の標的遺伝子特異的領域を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項16】

前記RNA分子がイントロン配列を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記イントロン配列が、pdk2イントロン、トウゴマ由来のカタラーゼイントロン、ワタ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、シロイヌナズナ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、トウモロコシ由来のユビキチンイントロン、イネ由来のアクチンイントロン、アスペルギルス由来のトリオースリン酸イソメラーゼイントロン、およびSV40由来のイントロンからなる群より選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記真核生物が植物である、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項19】

前記植物が、シロイヌナズナ、アルファルファ、オオムギ、マメ、トウモロコシ、ワタ、アマ、エンドウ、セイヨウアブラナ、イネ、ライムギ、ベニバナ、モロコシ、ダイズ、ヒマワリ、タバコ、コムギ、アスパラガス、ビート、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、キュウリ、ナス、レタス、タマネギ、アブラナ、コショウ、ジャガイモ、カボチャ、ラディッシュ、ハウレンソウ、カボチャ属、トマト、ズッキーニ、アーモンド、リンゴ、アンズ、バナナ、ブラックベリー、ブルーベリー、カカオ、サクランボ、ココヤシ、クランベリー、ナツメヤシ、ブドウ、グレープフルーツ、グアバ、キウイ、レモン、ライム、マンゴー、メロン、ネクタリン、オレンジ、パパイヤ、パッションフルーツ、モモ、ラッカセイ、ナシ、パイナップル、ピスタチオ、プラム、ラズベリー、イチゴ、タンジェリン、クルミ、およびスイカからなる群より選択される、請求項18に記載の方法。 40

【請求項20】

前記真核生物が真菌、酵母または糸状菌である、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記真核生物が動物である、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記動物が、ヒト、哺乳動物、魚、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、げっ歯類、ハムスター、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、霊長類、線虫類、甲殻動物、エビ、カニ、ロブ 50

スター、昆虫、ミバエ、鞘翅目の昆虫、双翅目の昆虫、鱗翅目の昆虫、または同翅亜目の昆虫である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記キメラRNAがキメラDNA分子からの転写により生成される、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

真核生物の細胞における標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするためのキメラRNA分子であって、

a) 前記真核生物の前記細胞中の標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む標的遺伝子特異的RNA領域と、これに機能的に連結された

10

b) 大部分が二本鎖のRNA領域、
を含んでなり、前記真核生物の細胞に供給されると、前記標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションする、上記キメラRNA分子。

【請求項25】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス(PSTVd)型のウイルス由来の核局在化シグナルを含む、請求項24に記載のキメラRNA分子。

【請求項26】

核局在化シグナルが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス、カンキツウイルス種III、カンキツウイルス種IV、ホップ潜在ウイルス、オーストラリアブドウウイルス、トマトプラントマチュウイルス、ココヤシチナンガヤウイルス、トマト頂端矮化ウイルス、ココヤシカダング-カダングウイルス、カンキツエクソコーティスウイルス、コルムネア潜在ウイルス、ホップ矮化ウイルス、およびカンキツベントリーフウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、請求項25に記載のキメラRNA分子。

20

【請求項27】

前記ウイルスが配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択されるゲノムヌクレオチド配列を有する、請求項25または26に記載のキメラRNA分子。

30

【請求項28】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルチューバーウイルス由来である、請求項25または26に記載のキメラRNA分子。

【請求項29】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルウイルスRG1株由来である、請求項25または26に記載のキメラRNA分子。

【請求項30】

核局在化シグナルが、配列番号3のヌクレオチド配列から選択される核局在化シグナルとして機能するヌクレオチド配列を含む、請求項25～29のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

40

【請求項31】

大部分が二本鎖のRNAが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IIIのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IVのゲノムヌクレオチド配列、ホップ潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、オーストラリアブドウウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマトプラントマチュウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシチナンガヤウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマト頂端矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシカダング-カダングウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツエクソコーティスウイルスのゲノムヌクレオチド配列、コルムネア潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ホップ矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、およびカンキツベントリーフウイルスのゲノムヌクレ

50

オチド配列からなる群より選択されるウィロイドゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項25または26に記載のキメラRNA分子。

【請求項32】

ウィロイドゲノムヌクレオチド配列が配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択される、請求項31に記載のキメラRNA分子。

【請求項33】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウィロイドのゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項25～32のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

【請求項34】

ウィロイドゲノムヌクレオチド配列がジャガイモスピンドルチューバーウィロイドRG1株のゲノムヌクレオチド配列である、請求項33に記載のキメラRNA分子。

【請求項35】

前記ゲノムヌクレオチド配列が配列番号3のヌクレオチド配列を有する、請求項34に記載のキメラRNA分子。

【請求項36】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの少なくとも35回の繰返しを含む、請求項24に記載のキメラRNA分子。

【請求項37】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの44～2000回の繰返しを含む、請求項36に記載のキメラRNA分子。

【請求項38】

前記RNA分子が複数の標的遺伝子特異的領域を含む、請求項24～37のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

【請求項39】

前記RNA分子がイントロン配列を含む、請求項24～38のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

【請求項40】

前記イントロン配列が、pdk2イントロン、トウゴマ由来のカタラーゼイントロン、ワタ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、シロイヌナズナ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、トウモロコシ由来のユビキチンイントロン、イネ由来のアクチンイントロン、アスペルギルス由来のトリオースリン酸イソメラーゼイントロン、およびSV40由来のイントロンからなる群より選択される、請求項39に記載のキメラRNA分子。

【請求項41】

真核生物の細胞における標的遺伝子の発現を低下させるためのキメラDNA分子であって、

a) 前記真核生物の細胞においてRNAポリメラーゼにより認識され得るプロモーターまたはプロモーター領域と、これに機能的に連結された

b) 転写されたときRNA分子をもたらすDNA領域、

を含んでなり、ここにおいて、前記RNA分子は、

i) 前記真核生物の前記細胞中の標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む標的遺伝子特異的RNA領域と、これに機能的に連結された

ii) 大部分が二本鎖のRNA領域、

を含むものであり、前記真核生物の細胞に供給されると、前記標的遺伝子の発現を低下させる、上記キメラDNA分子。

【請求項42】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウィロイド(PSTVd)型のウィロイド由来の核局在化シグナルを含む、請求項41に記載のキメラDNA分子。

10

20

30

40

50

【請求項 4 3】

核局在化シグナルが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス、カンキツウイルス種III、カンキツウイルス種IV、ホップ潜在ウイルス、オーストラリアブドウウイルス、トマトプラントマチュウイルス、ココヤシチナンガイウイルス、トマト頂端矮化ウイルス、ココヤシカダング-カダングウイルス、カンキツエクソコーティスウイルス、コルムネア潜在ウイルス、ホップ矮化ウイルス、およびカンキツペントリーフウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、請求項42に記載のキメラDNA分子。

【請求項 4 4】

前記ウイルスが配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択されるゲノムヌクレオチド配列を有する、請求項42または43に記載のキメラDNA分子。 10

【請求項 4 5】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルチューバーウイルス由来である、請求項42～44のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。

【請求項 4 6】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルウイルスRG1株由来である、請求項45に記載のキメラDNA分子。

【請求項 4 7】

核局在化シグナルが、配列番号3のヌクレオチド配列から選択される核局在化シグナルとして機能するヌクレオチド配列を含む、請求項42～46のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。 20

【請求項 4 8】

大部分が二本鎖のRNAが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IIIのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IVのゲノムヌクレオチド配列、ホップ潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、オーストラリアブドウウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマトプラントマチュウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシチナンガイウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマト頂端矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシカダング-カダングウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツエクソコーティスウイルスのゲノムヌクレオチド配列、コルムネア潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ホップ矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、およびカンキツペントリーフウイルスのゲノムヌクレオチド配列からなる群より選択されるウイルスゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項42または43に記載のキメラDNA分子。 30

【請求項 4 9】

ウイルスゲノムヌクレオチド配列が配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択される、請求項48に記載のキメラDNA分子。

【請求項 5 0】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項42～49のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。 40

【請求項 5 1】

ウイルスゲノムヌクレオチド配列がジャガイモスピンドルチューバーウイルスRG1株のゲノムヌクレオチド配列である、請求項50に記載のキメラDNA分子。

【請求項 5 2】

前記ゲノムヌクレオチド配列が配列番号3のヌクレオチド配列を有する、請求項51に記載のキメラDNA分子。

【請求項 5 3】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの少なくとも35回の繰返しを含む、請求項41に記載のキメラDNA分子。 50

【請求項 5 4】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの44～2000回の繰返しを含む、請求項53に記載のキメラDNA分子。

【請求項 5 5】

前記RNA分子が複数の標的遺伝子特異的領域を含む、請求項41～54のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。

【請求項 5 6】

前記RNA分子がイントロン配列を含む、請求項41～55のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。

【請求項 5 7】

前記イントロン配列が、pdk2イントロン、トウゴマ由来のカタラーゼイントロン、ワタ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、シロイヌナズナ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、トウモロコシ由来のユビキチンイントロン、イネ由来のアクチンイントロン、アスペルギルス由来のトリオースリン酸イソメラーゼイントロン、およびSV40由来のイントロンからなる群より選択される、請求項56に記載のキメラDNA分子。

10

【請求項 5 8】

前記RNA分子をコードする前記DNA領域に機能的に連結された転写終結およびポリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項41～56のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。

【請求項 5 9】

前記プロモーターまたはプロモーター領域が植物で発現可能なプロモーターである、請求項41～58のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。

20

【請求項 6 0】

前記プロモーターまたはプロモーター領域が動物において機能するプロモーターである、請求項41～58のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。

【請求項 6 1】

前記プロモーターまたはプロモーター領域が酵母、真菌または糸状菌において機能するプロモーターである、請求項41～58のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。

【請求項 6 2】

前記プロモーターまたはプロモーター領域が単一サブユニットバクテリオファージRNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターである、請求項41～58のいずれか1項に記載のキメラDNA分子。

30

【請求項 6 3】

請求項41～62のいずれか1項に記載のキメラDNA分子を含む真核生物由来の細胞。

【請求項 6 4】

請求項24～40のいずれか1項に記載のキメラRNA分子を含む真核細胞。

【請求項 6 5】

前記真核生物が植物である、請求項63または64に記載の細胞。

【請求項 6 6】

前記植物が、シロイヌナズナ、アルファルファ、オオムギ、マメ、トウモロコシ、ワタ、アマ、エンドウ、セイヨウアブラナ、イネ、ライムギ、ベニバナ、モロコシ、ダイズ、ヒマワリ、タバコ、コムギ、アスパラガス、ビート、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、キュウリ、ナス、レタス、タマネギ、アブラナ、コショウ、ジャガイモ、カボチャ、ラディッシュ、ハウレンソウ、カボチャ属、トマト、ズッキーニ、アーモンド、リンゴ、アンズ、バナナ、ブラックベリー、ブルーベリー、カカオ、サクランボ、ココヤシ、クランベリー、ナツメヤシ、ブドウ、グレープフルーツ、グアバ、キウイ、レモン、ライム、マンゴー、メロン、ネクタリン、オレンジ、パパイア、パッションフルーツ、モモ、ラッカセイ、ナシ、パイナップル、ピスタチオ、プラム、ラズベリー、イチゴ、タンジェリン、クルミ、およびスイカからなる群より選択される、請求項65に記載の細胞。

40

【請求項 6 7】

50

前記真核生物が真菌、酵母または糸状菌である、請求項63または64に記載の細胞。

【請求項68】

前記真核生物が動物である、請求項63または64に記載の細胞。

【請求項69】

前記動物が、ヒト、哺乳動物、魚、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、げっ歯類、ハムスター、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、霊長類、線虫類、甲殻動物、エビ、カニ、ロブスター、昆虫、ミバエ、鞘翅目の昆虫、双翅目の昆虫、鱗翅目の昆虫、または同翅亜目の昆虫である、請求項68に記載の細胞。

【請求項70】

細胞中に請求項41～62のいずれか1項に記載のキメラDNA分子を含む非ヒト真核生物。

10

【請求項71】

細胞中に請求項24～40のいずれか1項に記載のキメラRNA分子を含む非ヒト真核生物。

【請求項72】

前記真核生物が植物である、請求項70または71に記載の非ヒト真核生物。

【請求項73】

前記植物が、シロイヌナズナ、アルファルファ、オオムギ、マメ、トウモロコシ、ワタ、アマ、エンドウ、セイヨウアブラナ、イネ、ライムギ、ベニバナ、モロコシ、ダイズ、ヒマワリ、タバコ、コムギ、アスパラガス、ビート、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、キュウリ、ナス、レタス、タマネギ、アブラナ、コショウ、ジャガイモ、カボチャ、ラディッシュ、ホウレンソウ、カボチャ属、トマト、ズッキーニ、アーモンド、リンゴ、アンズ、バナナ、ブラックベリー、ブルーベリー、カカオ、サクランボ、ココヤシ、クランベリー、ナツメヤシ、ブドウ、グレープフルーツ、グアバ、キウイ、レモン、ライム、マンゴー、メロン、ネクタリン、オレンジ、パパイヤ、パッションフルーツ、モモ、ラッカセイ、ナシ、パイナップル、ピスタチオ、プラム、ラズベリー、イチゴ、タンジェリン、クルミ、およびスイカからなる群より選択される、請求項72に記載の非ヒト真核生物。

20

【請求項74】

前記真核生物が真菌、酵母または糸状菌である、請求項70または71に記載の非ヒト真核生物。

【請求項75】

前記真核生物が動物である、請求項70または71に記載の非ヒト真核生物。

30

【請求項76】

前記動物が、ヒト、哺乳動物、魚、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、げっ歯類、ハムスター、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、霊長類、線虫類、甲殻動物、エビ、カニ、ロブスター、昆虫、ミバエ、鞘翅目の昆虫、双翅目の昆虫、鱗翅目の昆虫、または同翅亜目の昆虫である、請求項75に記載の非ヒト真核生物。

【請求項77】

真核生物の細胞における標的遺伝子の発現を低下させるための請求項24～40のいずれか1項に記載のキメラRNA分子の使用。

【請求項78】

真核生物の細胞における標的遺伝子の発現を低下させるための請求項41～62のいずれか1項に記載のキメラDNA分子の使用。

40

【請求項79】

細胞における標的遺伝子の発現が低下しているトランスジェニック真核生物の作製方法であって、以下のステップ：

a) 前記生物の1個以上の細胞に請求項41～62のいずれか1項に記載のキメラDNA分子を供給して、1個以上のトランスジェニック細胞を作製すること、

b) 前記1個以上のトランスジェニック細胞からトランスジェニック真核生物を成長または再生させること、
を含んでなる上記方法。

50

【請求項 80】

真核生物の細胞における標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするための方法であって、以下のステップ：

a) 真核生物の細胞に第1および第2のキメラRNA分子を供給すること、ただし、

i) 第1のキメラRNA分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

ii) 第2のキメラRNA分子は、第1のキメラRNA分子の相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

iii) 第1および第2のキメラRNAは、少なくとも、第1のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドと第2のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドの間で塩基対合することができること、

iv) ここにおいて、第1または第2のキメラRNA分子のいずれかが、前記アンチセンス標的遺伝子特異的RNA領域または前記センス標的遺伝子特異的RNA領域に機能的に連結された、大部分が二本鎖のRNA領域を含むこと、

b) 標的遺伝子の発現がダウンレギュレーションされている真核生物を同定すること、を含んでなる上記方法。

【請求項 81】

第1および第2のキメラRNA分子が大部分が二本鎖のRNA領域を含む、請求項80に記載の方法。

【請求項 82】

第1および第2のキメラRNA分子が、同一の、大部分が二本鎖のRNA領域を含む、請求項81に記載の方法。

【請求項 83】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス (PSTVd) 型のウイルス由来の核局在化シグナルを含む、請求項80～82のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 84】

核局在化シグナルが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス、カンキツウイルス種III、カンキツウイルス種IV、ホップ潜在ウイルス、オーストラリアブドウウイルス、トマトプラントマチュウウイルス、ココヤシチナンガヤウイルス、トマト頂端矮化ウイルス、ココヤシカダング-カダングウイルス、カンキツエクソコーティスウイルス、コルムネア潜在ウイルス、ホップ矮化ウイルス、およびカンキツベントリーフウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、請求項83に記載の方法。

【請求項 85】

前記ウイルスが配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択されるゲノムヌクレオチド配列を有する、請求項83に記載の方法。

【請求項 86】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルチューバーウイルス由来である、請求項83～85のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 87】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルウイルスRG1株由来である、請求項83～86のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 88】

核局在化シグナルが、配列番号3のヌクレオチド配列から選択される核局在化シグナルとして機能するヌクレオチド配列を含む、請求項83～87のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 89】

大部分が二本鎖のRNAが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IIIのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IVのゲノムヌクレオチド配列、ホップ潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、オーストラリアブドウウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマトプラントマチュウウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシチナンガイウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマト頂端矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシカダング-カダングウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツエクソコーティスウイルスのゲノムヌクレオチド配列、コルムネア潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ホップ矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、およびカンキツベントリーフウイルスのゲノムヌクレオチド配列からなる群より選択されるウイルスゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項83または84に記載の方法。

10

【請求項 90】

ウイルスゲノムヌクレオチド配列が配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択される、請求項89に記載の方法。

【請求項 91】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項83～90のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 92】

ウイルスゲノムヌクレオチド配列がジャガイモスピンドルチューバーウイルスRG1株のゲノムヌクレオチド配列である、請求項91に記載の方法。

20

【請求項 93】

前記ゲノムヌクレオチド配列が配列番号3のヌクレオチド配列を有する、請求項92に記載の方法。

【請求項 94】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの少なくとも35回の繰返しを含む、請求項80～82のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 95】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの44～2000回の繰返しを含む、請求項94に記載の方法。

30

【請求項 96】

前記RNA分子が複数の標的遺伝子特異的領域を含む、請求項80～95のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 97】

前記RNA分子がイントロン配列を含む、請求項80～96のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 98】

前記イントロン配列が、pdk2イントロン、トウゴマ由来のカタラーゼイントロン、ワタ由来のデルタ12デサチラーゼイントロン、シロイヌナズナ由来のデルタ12デサチラーゼイントロン、トウモロコシ由来のユビキチンイントロン、イネ由来のアクチンイントロン、アスペルギルス由来のトリオースリン酸イソメラーゼイントロン、およびSV40由来のイントロンからなる群より選択される、請求項97に記載の方法。

40

【請求項 99】

第1および第2のキメラRNAが第1および第2のキメラ遺伝子から転写される、請求項80～98のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 100】

第1および第2のキメラRNA分子を含む真核生物由来の細胞であって、

i) 第1のキメラRNA分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

50

ii) 第2のキメラRNA分子は、第1のキメラRNA分子の相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

iii) 第1および第2のキメラRNAは、少なくとも、第1のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドと第2のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドの間で塩基対合することができること、

iv) ここにおいて、第1または第2のキメラRNA分子のいずれかが、前記アンチセンス標的的特異的RNA領域または前記センス標的的特異的RNA領域に機能的に連結された、大部分が二本鎖のRNA領域を含むこと、
を特徴とする、上記細胞。

10

【請求項101】

第1および第2のキメラRNA分子が、大部分が二本鎖のRNA領域を含む、請求項100に記載の細胞。

【請求項102】

第1および第2のキメラRNA分子が、同一の、大部分が二本鎖のRNA領域を含む、請求項101に記載の細胞。

【請求項103】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス(PSTVd)型のウイルス由来の核局在化シグナルを含む、請求項100~102のいずれか1項に記載の細胞。

20

【請求項104】

核局在化シグナルが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス、カンキツウイルス種III、カンキツウイルス種IV、ホップ潜在ウイルス、オーストラリアブドウウイルス、トマトプラントマチュウイルス、ココヤシチナンガヤウイルス、トマト頂端矮化ウイルス、ココヤシカダング-カダングウイルス、カンキツエクソコーティスウイルス、コルムネア潜在ウイルス、ホップ矮化ウイルス、およびカンキツベントリーフウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来する、請求項103に記載の細胞。

【請求項105】

前記ウイルスが配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択されるゲノムヌクレオチド配列を有する、請求項103に記載の細胞。

30

【請求項106】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルチューバーウイルス由来である、請求項103~105のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項107】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルウイルスRG1株由来である、請求項103~106のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項108】

核局在化シグナルが、配列番号3のヌクレオチド配列から選択される核局在化シグナルとして機能するヌクレオチド配列を含む、請求項103~107のいずれか1項に記載の細胞。

40

【請求項109】

大部分が二本鎖のRNAが、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IIIのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイルス種IVのゲノムヌクレオチド配列、ホップ潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、オーストラリアブドウウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマトプラントマチュウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシチナンガヤウイルスのゲノムヌクレオチド配列、トマト頂端矮化ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシカダング-カダングウイルスのゲノムヌクレオチド配列、カンキツエクソコーティスウイルスのゲノムヌクレオチド配列、コルムネア潜在ウイルスのゲノムヌクレオチド配列、ホップ矮化ウイロ

50

イドのゲノムヌクレオチド配列、およびカンキツペントリーフウィロイドのゲノムヌクレオチド配列からなる群より選択されるウィロイドゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項103または104に記載の細胞。

【請求項110】

ウィロイドゲノムヌクレオチド配列が配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択される、請求項109に記載の細胞。

【請求項111】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウィロイドのゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項103～109のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項112】

ウィロイドゲノムヌクレオチド配列がジャガイモスピンドルチューバーウィロイドRG1株のゲノムヌクレオチド配列である、請求項111に記載の細胞。

【請求項113】

前記ゲノムヌクレオチド配列が配列番号3のヌクレオチド配列を有する、請求項112に記載の細胞。

【請求項114】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの少なくとも35回の繰返しを含む、請求項100～102のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項115】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの44～2000回の繰返しを含む、請求項114に記載の細胞。

【請求項116】

前記RNA分子が複数の標的遺伝子特異的領域を含む、請求項100～115のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項117】

前記RNA分子がイントロン配列を含む、請求項100～116のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項118】

前記イントロン配列が、pdk2イントロン、トウゴマ由来のカタラーゼイントロン、ワタ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、シロイヌナズナ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、トウモロコシ由来のユビキチンイントロン、イネ由来のアクチンイントロン、アスペルギルス由来のトリオースリン酸イソメラーゼイントロン、およびSV40由来のイントロンからなる群より選択される、請求項117に記載の細胞。

【請求項119】

第1および第2のキメラRNAが第1および第2のキメラ遺伝子から転写される、請求項100～118のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項120】

請求項100～119のいずれか1項に記載の細胞を含む非ヒト真核生物。

【請求項121】

キメラアンチセンスRNA分子と協同して、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現を低下させるためのキメラセンスRNA分子であって、

a) 前記標的遺伝子のヌクレオチドに対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンス標的遺伝子特異的RNA領域と、これに機能的に連結された

b) 大部分が二本鎖のRNA領域、
を含んでなる上記キメラセンスRNA分子。

【請求項122】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウィロイド(PSTVd)型のウィロイド由来の核局在化シグナルを含む、請求項121に記載のキメラRNA分子。

【請求項123】

核局在化シグナルが、ジャガイモスピンドルチューバーウィロイド、カンキツウィロイ

10

20

30

40

50

ド種III、カンキツウイロイド種IV、ホップ潜在ウイロイド、オーストラリアブドウウイロイド、トマトプラントマチョウイロイド、ココヤシチナンガヤウイロイド、トマト頂端矮化ウイロイド、ココヤシカダング-カダングウイロイド、カンキツエクソコーティスウイロイド、コルムネア潜在ウイロイド、ホップ矮化ウイロイド、およびカンキツペントリーフウイロイドからなる群より選択されるウイロイドに由来する、請求項122に記載のキメラRNA分子。

【請求項124】

前記ウイロイドが配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択されるゲノムヌクレオチド配列を有する、請求項123に記載のキメラRNA分子。

10

【請求項125】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルチューバーウイロイド由来である、請求項122~124のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

【請求項126】

核局在化シグナルがジャガイモスピンドルウイロイドRG1株由来である、請求項122~125のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

【請求項127】

核局在化シグナルが、配列番号3のヌクレオチド配列から選択される核局在化シグナルとして機能するヌクレオチド配列を含む、請求項122~126のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

20

【請求項128】

大部分が二本鎖のRNAが、ジャガイモスピンドルチューバーウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイロイド種IIIのゲノムヌクレオチド配列、カンキツウイロイド種IVのゲノムヌクレオチド配列、ホップ潜在ウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、オーストラリアブドウウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、トマトプラントマチョウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシチナンガヤウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、トマト頂端矮化ウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、ココヤシカダング-カダングウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、カンキツエクソコーティスウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、コルムネア潜在ウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、ホップ矮化ウイロイドのゲノムヌクレオチド配列、およびカンキツペントリーフウイロイドのゲノムヌクレオチド配列からなる群より選択されるウイロイドゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項122または123に記載のキメラRNA分子。

30

【請求項129】

ウイロイドゲノムヌクレオチド配列が配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択される、請求項128に記載のキメラRNA分子。

【請求項130】

大部分が二本鎖のRNA領域が、ジャガイモスピンドルチューバーウイロイドのゲノムヌクレオチド配列を含む、請求項122~129のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

【請求項131】

ウイロイドゲノムヌクレオチド配列がジャガイモスピンドルチューバーウイロイドRG1株のゲノムヌクレオチド配列である、請求項130に記載のキメラRNA分子。

40

【請求項132】

前記ゲノムヌクレオチド配列が配列番号3のヌクレオチド配列を有する、請求項131に記載のキメラRNA分子。

【請求項133】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの少なくとも35回の繰返しを含む、請求項121に記載のキメラRNA分子。

【請求項134】

大部分が二本鎖のRNA領域が、トリヌクレオチドCUGの44~2000回の繰返しを含む、請求

50

項133に記載のキメラRNA分子。

【請求項135】

前記RNA分子が複数の標的遺伝子特異的領域を含む、請求項121～134のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

【請求項136】

前記RNA分子がイントロン配列を含む、請求項121～135のいずれか1項に記載のキメラRNA分子。

【請求項137】

前記イントロン配列が、pdk2イントロン、トウゴマ由来のカタラーゼイントロン、ワタ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、シロイヌナズナ由来のデルタ12デサチュラーゼイントロン、トウモロコシ由来のユビキチンイントロン、イネ由来のアクチンイントロン、アスペルギルス由来のトリオースリン酸イソメラーゼイントロン、およびSV40由来のイントロンからなる群より選択される、請求項136に記載のキメラRNA分子。

【請求項138】

真核生物の細胞における標的遺伝子の発現を低下させるためのキメラDNA分子であって、

a) 前記真核生物の細胞においてRNAポリメラーゼにより認識され得るプロモーターまたはプロモーター領域と、これに機能的に連結された

b) 転写されたとき、請求項121～137のいずれか1項に記載のキメラセンスRNA分子をもたらすDNA領域、
を含んでなる上記キメラDNA分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、真核細胞および真核生物における関心のある遺伝子の発現を効率よくダウンレギュレーション（下方制御）するための方法に関する。そのために、本発明は、改変されたアンチセンスおよびセンスRNA分子、前記改変されたアンチセンスまたはセンスRNA分子をコードするキメラ遺伝子、ならびに改変されたアンチセンスおよび/またはセンスRNA分子またはそれをコードするキメラ遺伝子を含む植物、動物、または真菌、酵母もしくは糸状菌のような真核生物を提供する。

【背景技術】

【0002】

近年、干渉RNA（RNAi）とも呼ばれる二本鎖RNA（dsRNA）またはヘアピンRNAの導入は、動物、真菌または植物を含む多数の真核生物において遺伝子サイレンシングを誘発するための有効なトリガーとなることが明らかにされている。

【0003】

dsRNA介在遺伝子サイレンシングの定性レベル（ある生物内の遺伝子サイレンシングのレベル）および定量レベル（ある集団内で顕著なレベルの遺伝子サイレンシングを示す生物の数）はどちらも、以前のアンチセンスRNAまたはセンスRNA介在遺伝子サイレンシング法より優れていることが判明した。

【0004】

実際上は、アンチセンスRNA分子およびこのようなアンチセンスRNAをコードするキメラ遺伝子の作製は、dsRNA分子またはそれをコードする遺伝子の作製よりも直接的である。事実、キメラ核酸dsRNA分子やそれをコードする遺伝子は、大きな、多かれ少なかれ完全な、逆方向反復構造を含み、かかる構造は、中間クローニング宿主の原核細胞内にこれらの核酸を完全な状態で維持することを妨げる傾向がある。アンチセンスRNA介在遺伝子サイレンシングの効率を高めるための、後述する方法および手段は、様々な実施形態および特許請求の範囲において説明するように、この問題に対する解決策を提供するものである。

【0005】

10

20

30

40

50

US 5,190,131およびEP 0 467 349 A1は、非天然の核酸配列を細胞の遺伝物質に組み込んだり、または該遺伝物質と結合させたりすることにより、細胞における遺伝子の発現を調節または抑制するための方法および手段を開示している。前記配列が転写されるとmRNAが生成され、このmRNAは前記細胞の遺伝物質により生産されるmRNAに相補的で、該mRNAと結合することができる。

【0006】

EP 0 223 399 A1は、標的RNA鎖に実質的に相補的なネガティブRNA鎖の植物細胞内での転写を引き起こすことにより、植物に有用な体細胞変化を生じさせる方法を開示している。標的RNA鎖は遺伝子発現において生じるmRNA転写産物、ウイルスRNA、または植物細胞中に存在する他のRNAでありうる。ネガティブRNA鎖は標的RNA鎖の少なくとも一部に相補的

10

【0007】

EP 0 240 208は、植物細胞ゲノムにコードされる遺伝子の発現を調節するための方法を開示しており、この方法は、宿主内で機能するプロモーターの転写制御下に遺伝子を組み込むことにより達成される。この方法においては、転写されるDNAの鎖が、調節しようとする内在性遺伝子から転写されるDNAの鎖に対して相補的である。

【0008】

WO 95/15394およびUS 5908779は、核アンチセンスRNAによる阻害を介して(マウス)細胞における遺伝子発現を調節するための方法および構築物を開示している。この構築物は、プロモーター、アンチセンス配列、およびポリアデニル化機構とは無関係に3'末端を生成するシス-またはトランス-リボザイムを含んでおり、それによりRNA分子の細胞質への輸送を阻害する。

20

【0009】

WO 98/05770は、 $(GC)_n$ -パリンドローム- $(GC)_n$ または $(AT)_n$ -パリンドローム- $(AT)_n$ または $(CG)_n$ -パリンドローム- $(CG)_n$ のような特殊な二次構造を有するアンチセンスRNAを開示している。

【0010】

WO 01/12824は、宿主細胞の核に、異常な(好ましくは、ポリアデニル化されていない)標的特異的RNAを供給することにより、真核細胞(特に、植物細胞)における関心のある核酸の表現型発現を低下させるための方法および手段を開示している。好ましくは、ポリアデニル化されていない標的特異的RNAは、プロモーター、標的特異的RNAをコードするDNA領域、自己スプライシングリボザイム、ならびに3'末端形成とポリアデニル化に關与するDNA領域を含むキメラ遺伝子の転写により供給される。

30

【0011】

WO 02/10365は、真核生物における遺伝子抑制方法を提供し、この方法は、プロモーター、抑制しようとする遺伝子の少なくとも1つのアンチセンスおよび/またはセンスヌクレオチド配列を含む組換え構築物を用いて形質転換することにより達成され、その際、構築物の転写産物の核から細胞質への輸送が阻害される。1つの実施形態では、核から細胞質への輸送が正常な3'UTRの不在により阻害される。この構築物は場合により少なくとも1つの自己開裂性リボザイムを含んでいてもよい。また、この構築物は場合により、単一のプロモーターを用いて同時にダウンレギュレーションさせようとする複数の遺伝子に対するセンスおよび/またはアンチセンス配列を含むことができる。さらに、かかる組換え構築物を含むベクター、植物、動物、種子、配偶子、および胚も開示されている。

40

Zhaoら, J. Gen. Virology, 82, 1491-1497 (2001)には、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス(Potato spindle tuber viroid: PSTVd)の核ターゲティングを実証するための全植物アッセイにおけるジャガイモウイルスXに基づいたベクターの使用が記載されている。

【0012】

WO 02/00894は、遺伝子サイレンシング法に関し、この場合には、核酸構築物が転写される領域内にT塩基のストレッチからなるDNA配列を含んでいる。

50

【0013】

WO 02/00904は、遺伝子サイレンシング法に関し、この場合には、核酸構築物が、宿主により発現される少なくとも1つの標的mRNAに対する相同領域と、これに接近して、該宿主内のいずれの内蔵性RNAとも関係のない2つの相補的RNA領域を含んでいる（またはコードしている）。

【発明の開示】

【0014】

本発明の一実施形態では、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするための方法が提供され、この方法は、以下のステップ：

a) 真核生物の細胞にキメラRNA分子を供給すること、ここにおいて、前記キメラRNA分子は、

i) 標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む1つの標的遺伝子特異的領域または複数の標的遺伝子特異的領域と、これに機能的に連結された

ii) ジャガイモスピンドルチューバーウイルス（PSTVd）型のウイルス（例えば、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス、カンキツウイルス種III、カンキツウイルス種IV、ホップ潜在ウイルス、オーストラリアブドウウイルス、トマトプラントマチュウウイルス、ココヤシチナンガイウイルス、トマト頂端矮化ウイルス、ココヤシカダング-カダングウイルス、カンキツエクソコーティスウイルス、コルムネア潜在ウイルス、ホップ矮化ウイルス、およびカンキツペントリーフウイルス）由来の核局在化シグナルを含む大部分が二本鎖のRNA領域、またはトリヌクレオチドCUG、CAG、GACもしくはGUCの少なくとも35回の繰返し（例えば、これらのトリヌクレオチドの44~2000回の繰返し）を含む大部分が二本鎖のRNA領域、を含むものであること、

b) 標的遺伝子の発現がダウンレギュレーションされている真核生物を同定すること、を含んでなる。

【0015】

キメラRNA分子はイントロン配列を含んでいてもよい。ウイルスは配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、および配列番号8からなる群より選択されるゲノムヌクレオチド配列を含みうる。真核生物は植物であってよく、例えば、シロイヌナズナ（*Arabidopsis*）、アルファルファ、オオムギ、マメ、トウモロコシ、ワタ、アマ、エンドウ、セイヨウアブラナ、イネ、ライムギ、ベニバナ、モロコシ、ダイズ、ヒマワリ、タバコ、コムギ、アスパラガス、ビート、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、キュウリ、ナス、レタス、タマネギ、アブラナ、コショウ、ジャガイモ、カボチャ、ラディッシュ、ハウレンソウ、カボチャ属、トマト、ズッキーニ、アーモンド、リンゴ、アンズ、バナナ、ブラックベリー、ブルーベリー、カカオ、サクランボ、ココヤシ、クランベリー、ナツメヤシ、ブドウ、グレープフルーツ、グアバ、キーウィ、レモン、ライム、マンゴー、メロン、ネクタリン、オレンジ、パパイヤ、パッションフルーツ、モモ、ラッカセイ、ナシ、パイナップル、ピスタチオ、プラム、ラズベリー、イチゴ、タンジェリン、クルミ、およびスイカから選択される植物が含まれる。真核生物はまた、真菌、酵母もしくは糸状菌であってよく、また、ヒト、哺乳動物、魚、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、げっ歯類、ハムスター、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、霊長類、線虫類、甲殻動物、エビ、カニ、ロブスター、昆虫、ミバエ、鞘翅目（Coleopteran）の昆虫、双翅目（Dipteran）の昆虫、鱗翅目（Lepidopteran）の昆虫、または同翅亜目（Homopteran）の昆虫のような動物であってよい。

【0016】

本発明の目的は、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするためのキメラRNA分子を提供することであり、このキメラRNA分子は、

前記標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して

少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む標的遺伝子特異的RNA領域と、これに機能的に連結された、

ジャガイモスピンドルチューバーウイルス (PSTVd) 型のウイルス (例えば、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス、カンキツウイルス種III、カンキツウイルス種IV、ホップ潜在ウイルス、オーストラリアブドウウイルス、トマトプランタマチョウイルス、ココヤシチナンガヤウイルス、トマト頂端矮化ウイルス、ココヤシカダング-カダングウイルス、カンキツエクソコーティスウイルス、コルムネア潜在ウイルス、ホップ矮化ウイルス、およびカンキツペントリーフウイルス) 由来の核局在化シグナルを含む大部分が二本鎖のRNA領域、またはトリヌクレオチドCUG、CAG、GACもしくはGUCの少なくとも35回の繰返し (例えば、トリヌクレオチドCUG、CAG、GACもしくはGUCの44~2000回の繰返し) を含む大部分が二本鎖のRNA領域と、
を含んでなり、これにより、前記キメラRNA分子は、真核生物の細胞に供給されると、前記標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションする。

10

【0017】

本発明の別の目的は、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現を低下させるためのキメラDNA分子を提供することであり、このキメラDNA分子は、

a) 前記真核生物の細胞においてRNAポリメラーゼにより認識され得るプロモーターまたはプロモーター領域と、これに機能的に連結された

b) 転写されたときRNA分子をもたらすDNA領域と、
を含んでなり、ここにおいて、前記RNA分子は、

20

i) 前記標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む1つの標的遺伝子特異的領域または複数の標的遺伝子特異的領域と、これに機能的に連結された

ii) ジャガイモスピンドルチューバーウイルス (PSTVd) 型のウイルス (例えば、ジャガイモスピンドルチューバーウイルス、カンキツウイルス種III、カンキツウイルス種IV、ホップ潜在ウイルス、オーストラリアブドウウイルス、トマトプランタマチョウイルス、ココヤシチナンガヤウイルス、トマト頂端矮化ウイルス、ココヤシカダング-カダングウイルス、カンキツエクソコーティスウイルス、コルムネア潜在ウイルス、ホップ矮化ウイルス、およびカンキツペントリーフウイルス) 由来の核局在化シグナルを含む大部分が二本鎖のRNA領域、またはトリヌクレオチドCUG、CAG、GACもしくはGUCの少なくとも35回の繰返し (例えば、トリヌクレオチドCUG、CAG、GACもしくはGUCの44~2000回の繰返し) を含む大部分が二本鎖のRNA領域と、
を含むものであり、場合により、

30

iii) 前記RNA分子をコードする前記DNA領域に機能的に連結された転写終結およびポリアダニル化シグナルをさらに含み、

これにより、前記キメラDNA分子は、真核生物の細胞に供給されると、前記標的遺伝子の発現を低下させる。

【0018】

真核生物宿主に応じて、プロモーターまたはプロモーター領域は、動物内で機能するプロモーター、酵母、真菌もしくは糸状菌内で機能するプロモーター、または植物で発現可能なプロモーターでありうる。また、プロモーターは単一サブユニットバクテリオファージRNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターまたはプロモーター領域であってもよい。

40

【0019】

本発明はさらに、本発明に従うキメラDNAまたはRNA分子を含む真核生物由来の細胞、ならびに細胞内に本発明に従うキメラDNAまたはRNA分子を含む非ヒト真核生物を提供する。

【0020】

本発明のさらに別の目的は、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現を低下させるための、本発明に従うキメラRNAまたはDNA分子の使用を提供することである。

50

【0021】

本発明はさらに、細胞における標的遺伝子の発現が低下しているトランスジェニック真核生物の作製方法を提供し、この方法は、以下のステップ：

a) 前記生物の1個以上の細胞に本発明に従うキメラDNA分子を供給して、1個以上のトランスジェニック細胞を作製すること、

b) 前記1個以上のトランスジェニック細胞からトランスジェニック真核生物を成長または再生させること、
を含んでなる。

【0022】

本発明はまた、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするための方法を提供し、この方法は、以下のステップ：

a) 真核生物の細胞に第1および第2のキメラRNA分子を供給すること、ただし、

i) 第1のキメラRNA分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

ii) 第2のキメラRNA分子は、第1のキメラRNA分子の相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

iii) 第1および第2のキメラRNAは、少なくとも、第1のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドと第2のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドの間で塩基対合することができること、

iv) ここにおいて、第1または第2のキメラRNA分子のいずれかが、前記アンチセンス標的遺伝子特異的RNA領域または前記センス標的遺伝子特異的RNA領域に機能的に連結された、大部分が二本鎖のRNA領域を含むこと、

b) 標的遺伝子の発現がダウンレギュレーションされている真核生物を同定すること、を含んでなる。第1および第2のキメラRNA分子は両方とも、大部分が二本鎖のRNA領域を含んでいてもよい。

【0023】

本発明の別の目的は、第1および第2のキメラRNA分子を含む真核生物由来の細胞、（ならびに、かかる細胞を含む非ヒト真核生物）を提供することであり、

i) 第1のキメラRNA分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

ii) 第2のキメラRNA分子は、第1のキメラRNA分子の相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

iii) 第1および第2のキメラRNAは、少なくとも、第1のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドと第2のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドの間で塩基対合することができること、

ここにおいて、第1または第2のキメラRNA分子のいずれかは、前記アンチセンス標的遺伝子特異的RNA領域または前記センス標的遺伝子特異的RNA領域に機能的に連結された、大部分が二本鎖のRNA領域を含むこと、を特徴とする。

【0024】

本発明はさらに、キメラアンチセンスRNA分子と協同して、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現を低下させるためのキメラセンスRNA分子、またはそのようなキメラセンスRNA分子をコードするキメラDNA分子を提供し、前記キメラセンスRNA分子は、前記標的遺伝子のヌクレオチドに対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンス標的遺伝子特異的RNA領域と、こ

れに機能的に連結された大部分が二本鎖のRNA領域と、を含んでなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

遺伝子発現のアンチセンスRNA介在ダウンレギュレーションを高めるための、本明細書に記載の方法および手段は、予期せざる観察に基づくものであり、その観察とは、標的遺伝子特異的RNA配列を、ジャガイモスピンドルチューバーウイルスゲノムのヌクレオチド配列を含むRNA領域（そのRNAの核局在化シグナルを含む）のような、大部分が二本鎖のRNA領域に機能的に連結させると、植物細胞などの宿主生物の細胞に導入したとき、標的遺伝子の発現がダウンレギュレーションされた系統の数と、標的遺伝子の発現が顕著にダウンレギュレーションされ、阻止さえもされた系列の数の両方が増加した、というものである。

10

【0026】

したがって、本発明の一実施形態では、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするための方法が提供され、この方法は、以下のステップ：

a) 真核生物の細胞にキメラRNA分子を供給すること、ここにおいて、前記キメラRNA分子は、

i) 標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む標的遺伝子特異的RNA領域（「アンチセンスRNA」と、これに機能的に連結された

20

ii) 大部分が二本鎖のRNA領域、を含むものであること、

b) 標的遺伝子の発現がダウンレギュレーションされている真核生物を同定すること、を含んでなる。

【0027】

本明細書中で用いる「キメラ遺伝子」または「キメラ核酸」とは、特定の真核生物種に通常は見出せない遺伝子または核酸をさし、あるいはまた、プロモーターが転写されるDNA領域の全部もしくは一部と、または遺伝子の少なくとも1つの他の調節領域と自然界で結合していない遺伝子をさす。

【0028】

本明細書中で用いる「アンチセンスRNA」とは、標的遺伝子から転写される生物学的に活性なRNA（通常はmRNAであるが、これに限らない）のヌクレオチド配列の部分に対して大部分が相補的なヌクレオチド配列を含むRNA分子をさす。

30

【0029】

本明細書中で用いる「標的遺伝子」という表現は、真核細胞中に存在し、かつ生物学的に活性なRNAに転写される核酸をさす。標的遺伝子は内在性の遺伝子であってもよいし、真核細胞の祖先にヒトの介入を経て導入されたトランスジーンであってもよいし、アグロバクテリウム菌株またはレトロウイルスのような感染性生物により細胞のゲノムに導入された遺伝子であってもよい。標的遺伝子はウイルス起源のものであってもよい。さらに、少なくとも19個のヌクレオチドのストレッチはプロモーター領域、5' UTR、コード領域、または3' UTRから選択することができる。

40

【0030】

本明細書中で用いる「遺伝子発現」または「核酸の発現」とは、遺伝子または核酸が、適切な宿主細胞内に導入されたとき、RNAを生成するように転写（または複製）され、かつ/または、その宿主細胞においてポリペプチドもしくはタンパク質を生成するように翻訳されるプロセスをいう。

【0031】

本明細書中で用いる「遺伝子発現のダウンレギュレーション」とは、本発明のRNAまたはキメラ遺伝子の存在下での真核細胞における対象の標的遺伝子または核酸の発現と、本発明のRNAまたはキメラ遺伝子の不在下での対象の標的遺伝子または核酸の発現との比較

50

をさす。したがって、本発明のキメラRNAの存在下での標的遺伝子の発現は、その不在下での発現より低くなるべきであり、例えば、キメラRNAの不在下での表現型発現の約50%または約25%または約10%または約5%ほどでありうる。いくつかの用途の場合には、キメラRNAまたはキメラRNAをコードするキメラ遺伝子の存在によって発現が実際上完全に阻止されるべきである。

【0032】

本明細書中で用いる「含む」および「含んでなる」とは、そこに挙げた特徴、整数、ステップまたは成分の存在を特定するものと解釈されるべきであるが、1以上の特徴、整数、ステップまたは成分、あるいはそのグループの存在または付加を排除するものではない。したがって、ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列を含む核酸またはタンパク質は、実際に引き合いに出したものより多くのヌクレオチドまたはアミノ酸を含むことができ、すなわち、より大きな核酸またはタンパク質の中に組み込まれていてもよい。機能的にまたは構造的に特定されるDNA領域を含むキメラ遺伝子は、追加のDNA領域などを含むことができる。

10

【0033】

したがって、標的遺伝子特異的RNA領域の約19ntのアンチセンスRNAの最小ヌクレオチド配列は、サイズが19ntから標的遺伝子のサイズに等しい長さまでの間で変化し、全体的にさまざまな程度の配列同一性を有する、より大きなRNA分子内に含まれていてもよいことが明らかだろう。

【0034】

本発明において、2つの関連したヌクレオチドまたはアミノ酸配列の、パーセントで表される「配列同一性」とは、2つの最適にアライメントさせた配列において、同一の残基を有する位置の数を、比較した位置の数で割った値($\times 100$)をさす。ギャップ、すなわち、ある残基が一方の配列には存在するが、他方の配列には存在しないアライメント中の位置は、非同一致残基を有する位置とみなされる。2つの配列同士のアライメントはNeedlemanおよびWunschのアルゴリズム (NeedlemanおよびWunsch 1970)を用いて行う。上記のコンピュータ支援配列アライメントは、Wisconsin Package Version 10.1 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA)の一部であるGAPのような標準ソフトウェアプログラムにより、ギャップ生成ペナルティ50およびギャップ延長ペナルティ3を有するデフォルトスコアリングマトリックスを用いて、都合よく行うことができる。配列が少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、さらに好ましくは約90%、特に好ましくは約95%、さらに特に好ましくは約100%の配列同一性を有する場合、それらの配列は「実質的に類似している」とされる。RNA配列がDNA配列と実質的に類似しているか、ある程度の配列同一性を有する場合、DNA配列中のチミン(T)がRNA配列中のウラシル(U)と同等であるとみなされることは明らかである。したがって、本出願において、19個連続したヌクレオチドの配列が19個のヌクレオチドの配列に対して94%の配列同一性を有すると記載される場合、これは、第1配列の19個のヌクレオチドのうち少なくとも18個が第2配列の19個のヌクレオチドのうち18個と同一であることを意味する。

20

30

【0035】

したがって、記載されるアンチセンスヌクレオチド領域は、長さが約21nt、50nt、100nt、200nt、300nt、500nt、1000nt、2000nt、さらには約5000ntまたはそれ以上であってもよく、それぞれが約40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の全体的な配列同一性を有する。配列が長ければ長いほど、全体的な配列同一性の要件は厳格でなくなる。

40

【0036】

さらに、1つの標的遺伝子のヌクレオチド配列の相補体に対して配列同一性を有する複数の配列(複数の標的遺伝子特異的RNA領域)は、1つのRNA分子内に存在することができる。また、数個の標的遺伝子のヌクレオチド配列の相補体に対して配列同一性を有する複数の配列が1つのRNA分子内に存在してもよい。

50

【0037】

「標的遺伝子特異的」とは、本発明によるキメラ核酸が特定の標的遺伝子のダウンレギュレーションにのみ使用されるという意味に解釈されるべきでない。事実、標的遺伝子特異的RNA領域と別の遺伝子との間に十分な相同性が存在するか、または他の遺伝子が(いわゆる遺伝子ファミリーに属する遺伝子のように)19ヌクレオチドの同一のストレッチを共有する場合には、こうした他の遺伝子の発現もダウンレギュレーションされることがある。

【0038】

本明細書中で用いる「大部分が二本鎖のRNA領域」とは、内部の塩基対合により棒(rod)状構造にフォールディング可能なRNA分子をさす。生じる棒状構造は、そのRNA分子内の他の19個連続したヌクレオチドの別のストレッチの相補体に対して94%の配列同一性を有して、RNA分子が棒状構造にフォールディングしたとき二本鎖領域を形成することができる、19個連続したヌクレオチドのいかなるストレッチも含まない。換言すれば、フォールディングしたとき、大部分が二本鎖のRNA領域は、19bp中にせいぜい1つのミスマッチを有する少なくとも19bpの二本鎖RNA領域を含まず、少なくともエネルギー的に最も有利な棒状のコンフォメーションにおいては含まない。限定するものではないが、このような構造の例を図1に示す。

【0039】

本発明を特定の作用様式に限定するつもりはないが、そのような大部分が二本鎖のRNA領域は、それらが結合されるアンチセンスRNA分子の核局在化に関与すると考えられる。その結果、アンチセンスRNA分子の核内濃度が増加し、アンチセンスRNAに対応するセンスRNAとの塩基対合による配列特異的dsRNAがより効率的に形成される。

【0040】

本明細書中でRNA分子に関して用いる「棒状構造にフォールディング可能」という用語は、RNA分子が内部の塩基対合によって好ましく適応し、長い棒のような全体的な外観を有する二次構造を形成することをさす。棒状構造は分岐部または突出部(マッチしないヌクレオチドが全体的な構造から突き出ている部分)を含んでいてもよく、また、より大きな二次構造(棒状でもよいし、そうでなくてもよい)の一部であってもよい。棒状構造にフォールディング可能なRNA分子の例を図1に示す。

【0041】

適応する具体的な二次構造は、RNA分子の自由エネルギーにより決定され、FOLD RNA (ZukerおよびStiegler, 1981)またはGCGのMFOLD構造予測パッケージ (Genetics Computing Group; Zuker 1989, Science 244, 48-52)のような適当なソフトウェアを用いて様々な状況について予測することができる。

【0042】

本発明の一実施形態において、アンチセンスRNA分子に機能的に連結される大部分が二本鎖のRNA領域は、宿主細胞または宿主植物細胞の核内で複製することができるPSTVd(ジャガイモスピンドルチューバーウィロイド)のようなPSTVd型のウィロイドに由来する核局在化シグナルである。

【0043】

本発明の一実施形態において、大部分が二本鎖のRNA領域は、配列番号3に示すヌクレオチド配列のようなPSTVd RG1株の全長配列を含み、この配列は、下記のヌクレオチド配列:

5' -cgcagatctcggaactaaactcgtggttc-3' [配列番号1] および

5' -gcgagatctaggaaccaactcgcggttc-3' [配列番号2]

を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ウィロイドのRNAゲノムのcDNAコピーからの増幅により都合よく取得することができる。

【0044】

RNA分子に組み込む場合は、DNA分子に対応するRNA分子に変換するための追加のステップが必要であることが理解される。そのような変換は、転写、例えば単一サブユニットバ

10

20

30

40

50

クテリオファージRNAポリメラーゼを用いる *in vitro* 転写により達成することができる。

【0045】

RNA配列が、配列表のエントリー中に表示されている、または配列表に示したDNA配列と本質的に類似している、または該DNA配列に対してある程度の配列同一性を有する、とされる場合には、エントリー中の該配列に対応するRNA配列に言及していることが明らかである。ただし、DNA配列中のチミン(T)はRNA配列ではウラシル(U)に置き換えられる。その言及がRNA配列に対してなのか、DNA配列に対してなのかは、前後関係によりすぐに明らかになる。

【0046】

同様の大部分が二本鎖のRNA構造は、PSTVd型(またはBussiereら, 1996による分類に従うグループB)の他の核複製性ウイロイドのゲノム内にも見出され、これらのRNA配列も同様に効果的に使用することができる。PSTVdグループの他の核複製性ウイロイドとしては、カンキツウイロイド種III(Citrus viroid species III)、カンキツウイロイド種IV(Citrus viroid species IV)、コレウスウイロイド(Coleus viroid)、ホップ潜在ウイロイド(Hop latent viroid) (配列番号7)、オーストラリアブドウウイロイド(Australian grapevine viroid) (配列番号4)、トマトプランタマチョウイロイド(Tomato planta macho viroid) (配列番号6)、ココヤシチナンガヤウイロイド(Coconut tinangaja viroid) (配列番号5)、トマト頂端矮化ウイロイド(Tomato apical stunt viroid) (配列番号8)、ココヤシカダング-カダングウイロイド(Coconut cadang-cadang viroid)、カンキツエクソコーティスウイロイド(Citrus exocortis viroid)、コルムネア潜在ウイロイド(Columnea latent viroid)、ホップ矮化ウイロイド(Hop stunt viroid)、およびカンキツベントリーフウイロイド(Citrus bent leaf viroid)を挙げることができる。これらのウイロイドは自己スプライシング活性の不在によっても特徴づけられ、これはハンマーヘッドモチーフのような触媒モチーフが存在しないことで明らかになる (Busiereら, Nuc. Acids Res. 24, 1793-1798, 1996)。PSTVd型の全ウイロイドの中で完全なdsRNA構造の最長ストレッチは11塩基対のサイズである。通常、ミスマッチはかなり均一に分布している。

【0047】

これらのウイロイドのヌクレオチド配列は、世界的ウェブ(<http://www.callisto.si.us herb.ca/jpperra>または<http://nt.ars-grin.gov/subviral/>)によりアクセス可能なデータベースにコンプライされており、以下のものが含まれる：

ジャガイモスピンドルチューバーウイロイド(PSTVd) [PSTVd.1 (登録番号: J02287.gb), M16826.gb), V01465(embl); 333351(gi), 333352(gi)および62283(gi)); PSTVd.2 (登録番号: M38345.gb), 333354(gi)); PSTVd.3 (登録番号: M36163.gb), 333356(gi)); PSTVd.4 (登録番号: M14814.gb), 333357(gi)); PSTVd.5 (株: S.commersonii) (登録番号: M25199.gb), 333355(gi)); PSTVd.6 (株: tomato cv. Rutgers, 分離株: KF440-2) (登録番号: X58388(embl), 61366(gi)); PSTVd.7 (KF6-M弱毒株) (登録番号: M88681.gb), 333358(gi)); PSTVd.8 (Burdock株) (登録番号: M88678.gb), 333360(gi)); PSTVd.9 (Wisconsin (WB) 株) (登録番号: M88677.gb), 333359(gi)); PSTVd.10 (PSTVd-N (Naaldwijk) 株) (登録番号: X17268(embl), 60649(gi)); PSTVd.11 (弱毒株変異体A, WA-M分離株) (登録番号: X52036(embl), 61365(gi)); PSTVd.12 (弱毒株, F-M分離株) (登録番号: X52037(embl), 61367(gi)); PSTVd.13 (中程度の毒性株, F-IS分離株) (登録番号: X52039(embl), 61369(gi)); PSTVd.14 (有毒致死株, F-SL分離株) (登録番号: X52038(embl), 61368(gi)); PSTVd.15 (中程度の毒性株, F88-IS分離株) Herold, Tら, Plant Mol. Biol. 19, 329-333 (1992)に発表; PSTVd.16 (F88またはS88変異株) (登録番号: X52040(embl), 61370(gi)); PSTVd.17 (個体分離株 kf 5) (登録番号: M93685.gb), 333353(gi)); PSTVd.18 (KF5分離株) (登録番号: S54933.gb), 265593(gi)); PSTVd.19 (S-XII株, s27変種) (登録番号: X76845(embl), 639994(gi)); PSTVd.20 (S-XIII株, s23変種) (登録番号: X76846(embl), 639993(gi)); PSTVd.21 (M株(弱毒)) (登録番号: X76844(embl), 639992(gi)); PSTVd.22 (I-818株, I4変種) (登録番号: X76848(embl), 639991(gi)); PSTVd.23 (I-818株, I3変種) (登録番号: X76847(embl), 639990(gi)); PSTVd.24 (PSTVd-341株) (登録番

号：Z34272(emb1), 499191(gi)); PSTVd.25 (QF B株) (登録番号：U23060(gb), 755586(gi)) PSTVd.26 (QF A株) (登録番号：U23059(gb), 755585(gi)); PSTVd.27 (RG 1株) (登録番号：U23058(gb), 755584(gi)); PSTVd.28 (登録番号：U51895(gb), 1272375(gi)); PSTVd.29(ジャガイモスピンドルチューパーウィロイド) (登録番号：X97387(emb1), 1769438(gi)); PSTVd.30 (S27-VI-24株) (登録番号：Y09382(emb), 2154945(gi)); PSTVd.31 (S27-VI-19株) (登録番号：Y09383(emb), 2154944(gi)); PSTVd.32 (SXIII株) (登録番号：Y08852(emb), 2154943(gi)); PSTVd.33 (S27-I-8株) (登録番号：Y09381(emb), 2154942(gi)); PSTVd.34 (PSTV M-VI-15株) (登録番号：Y09577(emb), 2154941(gi)); PSTVd.35 (PSTV M-I-40株) (登録番号：Y09576(emb), 2154940(gi)); PSTVd.36 (PSTV M-I-17株) (登録番号：Y09575(emb), 2154939(gi)); PSTVd.37 (PSTV M-I-10株) (登録番号：Y09574(emb), 2154938(gi)); PSTVd.38 (I4-I-42変異株) (登録番号：Y09889(emb), 2154937(gi)); PSTVd.39 (PSTVd I2-VI-27変異株) (登録番号：Y09888(emb), 2154936(gi)); PSTVd.40 (PSTVd I2-VI-25変異株) (登録番号：Y09887(emb), 2154935(gi)); PSTVd.41 (PSTVd I2-VI-16変異株) (登録番号：Y09886(emb), 2154934(gi)); PSTVd.42 (PSTVd I4-I-10変異株) (登録番号：Y09890(emb), 2154933(gi)); PSTVd.43 (PSTVd I2-I-14変異株) (登録番号：Y09891(emb), 2154932(gi)); PSTVd.44 (KF7分離株) (登録番号：AJ007489(emb), 3367737(gi)); PSTVd.45 (登録番号：AF369530, 14133876(gi))];

【0048】

グループIIIカンキツウィロイド (CVd-III) [CVd-III.1 (登録番号：S76452(gb), 913161(gi)); CVd-III.2 (Australia New South Wales 分離株) (登録番号：S75465(gb)およびS76454(gb), 914078(gi)および913162(gi)); CVd-III.3 (登録番号：AF123879, GI:7105753); CVd-III.4 (登録番号：AF123878, GI:7105752) CVd-III.5 (登録番号：AF123877, GI:7105751); CVd-III.6 (登録番号：AF123876, GI:7105750); CVd-III.7 (登録番号：AF123875, GI:7105749); CVd-III.8 (登録番号：AF123874, GI:7105748); CVd-III.9 (登録番号：AF123873, GI:7105747); CVd-III.10 (登録番号：AF123872, GI:7105746); CVd-III.11 (登録番号：AF123871, GI:7105745); CVd-III.12 (登録番号：AF123870, GI:7105744); CVd-III.13 (登録番号：AF123869, GI:7105743); CVd-III.14 (登録番号：AF123868, GI:7105742); CVd-III.15 (登録番号：AF123867, GI:7105741); CVd-III.16 (登録番号：AF123866, GI:7105740); CVd-III.17 (登録番号：AF123865, GI:7105739); CVd-III.18 (登録番号：AF123864, GI:7105738); CVd-III.19 (登録番号：AF123863, GI:7105737); CVd-III.20 (登録番号：AF123860, GI:7105736); CVd-III.21 (登録番号：AF123859, GI:7105735); CVd-III.22 (登録番号：AF123858, GI:7105734); CVd-III.23 (登録番号：AB054619, GI:13537479); CVd-III.24 (登録番号：AB054620, GI:13537480); CVd-III.25 (登録番号：AB054621, GI:13537481); CVd-III.26 (登録番号：AB054622, GI:13537482); CVd-III.27 (登録番号：AB054623, GI:13537483); CVd-III.28 (登録番号：AB054624, GI:13537484); CVd-III.29 (登録番号：AB054625, GI:13537485); CVd-III.30 (登録番号：AB054626, GI:13537486); CVd-III.31 (登録番号：AB054627, GI:13537487); CVd-III.32 (登録番号：AB054628, GI:13537488); CVd-III.33 (登録番号：AB054629, GI:13537489); CVd-III.34 (登録番号：AB054630, GI:13537490); CVd-III.35 (登録番号：AB054631, GI:13537491); CVd-III.36 (登録番号：AB054632, GI:13537492); CVd-III.37 (登録番号：AF416552, GI:15811643); CVd-III.38 (登録番号：AF416553, GI:15811644); CVd-III.39 (登録番号：AF416374, GI:15788948); CVd-III.40 (登録番号：AF434680)];

【0049】

カンキツウィロイドIV (CVdIV) [CVdIV.1 (登録番号：X14638(emb1), 59042(gi))]

【0050】

コリウス(Coleus blumei)-1ウィロイド (CbVd-1) [CbVd.1 (コリウスウィロイド1 (CbVd.1), 栽培変種株Bienvenue, ドイツ分離株) (登録番号：X52960(emb1), 58844(gi)); CbVd.2 (コレウスイエローウィロイド(CYVd), ブラジル分離株) (登録番号：X69293(emb1), 59053(gi)); CbVd.3 (コリウスウィロイド1-RG ステム-ループRNA.) (登録番号：X95291(emb1), 1770104(gi)); CbVd.4 (コリウスウィロイド1-RL RNA) (登録番号：X95366(emb1),

1770106(gi))]

【 0 0 5 1 】

コリウス-2ウイルス (CbVd-2) [CbVd.1 (コリウスウイルス2-RL RNA) (登録番号: X95365(emb1), 1770107(gi)); CbVd.2 (コリウスウイルスCbVd 4-1 RNA) (登録番号: X97202(emb1), 1770109(gi))]

【 0 0 5 2 】

コリウス-3ウイルス (CbVd-3) [CbVd.1 (コリウスウイルス3-RL) (登録番号: X95364(emb1), 1770108(gi)); CbVd.2 (コリウス栽培変種「Fairway Ruby」由来のコリウスウイルス8) (登録番号: X57294(emb1), 780766(gi)); CbVd.3 (コリウスウイルス3-FR ステム-ループRNA, コリウス栽培変種「Fairway Ruby」由来) (登録番号: X95290(emb1), 1770105(gi))]

【 0 0 5 3 】

ホップ潜在ウイルス (HLVd)

[HLVd.1 (登録番号: X07397(emb1), 60259(gi)); HLVd.2 (「熱変異株(thermomutant)」T15) (登録番号: AJ290404(gb), 13872743(gi)); HLVd.3 (「熱変異株」T40) (登録番号: AJ290405.1(gb), 13872744(gi)); HLVd.4 (「熱変異株」T50) (登録番号: AJ290406(gb), 13872745(gi)); HLVd.5 (「熱変異株」T59) (登録番号: AJ290406(gb), 13872746(gi)); HLVd.6 (「熱変異株」T61) (登録番号: AJ290408(gb), 13872747(gi)); HLVd.7 (「熱変異株」T75) (登録番号: AJ290409(gb), 13872748(gi)); HLVd.8 (「熱変異株」T92) (登録番号: AJ290410(gb), 13872749(gi)); HLVd.9 (「熱変異株」T218) (登録番号: AJ290411(gb), 13872750(gi)); HLVd.10 (「熱変異株」T229) (登録番号: AJ290412(gb), 13872751(gi))]

【 0 0 5 4 】

オーストラリアブドウウイルス (AGVd) [AGVd.1 (登録番号: X17101(emb1), 58574(gi))]

【 0 0 5 5 】

トマトプランタマチョウイルス (TPMVd) [TPMVd.1 (登録番号: K00817(gb))]

【 0 0 5 6 】

ココヤシチナンガイウイルス (CTiVd) [CTiVd.1 (登録番号: M20731(gb), 323414(gi))]

【 0 0 5 7 】

トマト頂端矮化ウイルス (TASVd) [TASVd.1 (登録番号 K00818(gb), 335155(gi)); TASVd.2 (株: インドネシア) (登録番号: X06390(emb1), 60650(gi)); TASVd.3 (トマト頂端矮化ウイルス-S ステム-ループRNA.) (登録番号: X95293(emb1), 1771788(gi))]

【 0 0 5 8 】

カダング-カダングココヤシウイルス (CCCVd) [CCCVd.1 (分離株 baao 54, ccRNA 1 fast) (登録番号: J02049(gb), 323275(gi)); CCCVd.2 (分離株 baao 54, ccRNA 1 fast) (登録番号: J02050(gb), 323276(gi)); CCCVd.3 (分離株 baao 54, ccRNA 1 slow) (登録番号: J02051(gb), 323277(gi)); CCCVd.4 (分離株 Ligao 14B, 620C, 191DおよびT1, ccRNA 1 fast) (Haseloffら Nature 299, 316-321 (1982)) CCCVd.5 (分離株 Ligao T1, ccRNA 1 slow) (Haseloffら Nature 299, 316-321 (1982)); CCCVd.6 (分離株 Ligao 14B, ccRNA 1 slow) (Haseloffら Nature 299, 316-321 (1982)); CCCVd.7 (分離株 San Nasco, ccRNA 1 slow) (Haseloffら Nature 299, 316-321 (1982))]

【 0 0 5 9 】

カンキツエクソコーティスウイルス (CEVd) [CEVd.1 (gynura由来cev) (登録番号: J02053(gb), 323302(gi)); CEVd.2 (A株) (登録番号: M34917(gb), 323305(gi)); CEVd.3 (de25株) (登録番号: K00964(gb), 323303(gi)); CEVd.4 (de26株) (登録番号: K00965(gb), 323304(gi)); CEVd.5 (CEV-JB) (登録番号: M30870(gb), 484119(gi)); CEVd.6 (CEV-JA) (登録番号: M30869(gb), 484118(gi)); CEVd.7 (登録番号: M30871(gb), 484117(gi)); CEVd.8 (CEV-A) (登録番号: M30868(gb), 484116(gi)); CEVd.9 (Visvader, J.E.およびSy

mons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.10 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.11 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.12 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.13 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.14 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.15 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.16 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.17 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.18 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.19 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.20 (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.21 (cev-j classe B) (Visvader,J.E.および Symons,R.H. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920 (1985)); CEVd.22 (ブドウウイルス(GV)) (登録番号: Y00328(embl), 60645(gi)); CEVd.23 (CEVd-t) (登録番号: X53716(embl), 433503(gi)); CEVd.24 (CEVcls, トマトハイブリッドカルス分離株) (登録番号: S67446(gb), 141247(gi)); CEVd.25 (CEV D-92) (登録番号: S67442(gb), 141248(gi)); CEVd.26 (CEVt, トマトハイブリッド分離株) (登録番号: S67441(gb), 141246(gi)); CEVd.27 (CEVt, トマト分離株) (登録番号: S67440(gb), 141245(gi)); CEVd.28 (CEVg, Gynura分離株) (登録番号: S67438(gb), 141244(gi)); CEVd.29 (CEVc, シトロロン分離株) (登録番号: S67437(gb), 141243(gi)); CEVd.30 (CEVd-225株) (登録番号: U21126(gb), 710360(gi)); CEVd.31 (ソラマメ分離株, *Vicia faba* L.) (登録番号: S79831(gb), 1181910(gi)); CEVd.32 (トマトに cev.31 を接種した後に得られる変異株) (Fagoagaら J. Gen. Virol. 76, 2271-2277 (1995)); CEVd.33 (Fagoagaら J. Gen. Virol. 76, 2271-2277 (1995)); CEVd.34 (登録番号: AF298177, 15419885(gi)); CEVd.35 (登録番号: AF298178, 15419886(gi)); CEVd.36 (登録番号: AF428058) (カンキツエクソコーティスウイルス分離株 205-E-1 Uy, 完全なゲノム); CEVd.37 (登録番号: AF428059) (カンキツエクソコーティスウイルス分離株 205-E-2 Uy, 完全なゲノム); CEVd.38 (登録番号: AF428060) (カンキツエクソコーティスウイルス分離株 205-E-5 Uy, 完全なゲノム); CEVd.39 (登録番号: AF428061) (カンキツエクソコーティスウイルス分離株 205-E-7 Uy, 完全なゲノム); CEVd.40 (登録番号: AF428062) (カンキツエクソコーティスウイルス分離株 54-E-1 Uy, 完全なゲノム); CEVd.41 (登録番号: AF428063) (カンキツエクソコーティスウイルス分離株 54-E-3 Uy, 完全なゲノム); CEVd.42 (登録番号: AF428064) (カンキツエクソコーティスウイルス分離株 54-E-18 Uy, 完全なゲノム); CEVd.43 (登録番号: AF434678) (カンキツエクソコーティスウイルス, 完全なゲノム)]

【0060】

コルムネア潜在ウイルス (CLVd) [CLVd.1 (登録番号: X15663(embl), 58886(gi)); CLVd.2 (CLVd-N, 個体分離株 *Nematanthus*) (登録番号: M93686(gb), 323335(gi)); CLVd.3 (コルムネア潜在ウイルス-B ステム-ループRNA) (登録番号: X95292(embl), 1770174(gi))]

【0061】

カンキツベントリーフウイルス (CBLVd) [CBLVd.1 (CVd-Ib) (登録番号: M74065(gb), 323413(gi)); CBLVd.2 (CBLVd-225株) (登録番号: U21125(gb), 710359(gi)); CBLVd.3 (ウイルス Ia ゲノムRNA, 分離株: Jp) (登録番号: AB006734(dbj), 2815403(gi)); CBLVd.4 (ウイルス Ib ゲノムRNA, 分離株: P2) (登録番号: AB006735(dbj), 2815401(gi)); CBLVd.5 (ウイルス Ia ゲノムRNA) (登録番号: AB006736(dbj), 2815402(gi)); CBLVd.6 (カンキツウイルス Ia クローン17) (登録番号: AF040721(gb), 3273626(gi)); CBLVd.7 (カンキツウイルス Ia クローン18) (登録番号: AF040722(gb), 3273627(gi)); CBLVd.8 (カンキツベントリーフウイルス分離株 201-1-1 Uy, 完全なゲノム) (登録番号: AF428052); CBLVd.9 (カンキツベントリーフウイルス分離株 201-1-2 Uy, 完全なゲノム

10

20

30

40

50

) (登録番号: AF428053); CBLVd.10 (カンキツペントリーフウイルス分離株 201-1-5 Uy, 完全なゲノム) (登録番号: AF428054); CBLVd.11 (カンキツペントリーフウイルス分離株 205-1-1 Uy, 完全なゲノム) (登録番号: AF428055); CBLVd.12 (カンキツペントリーフウイルス分離株 205-1-3 Uy, 完全なゲノム) (登録番号: AF428056); CBLVd.13 (カンキツペントリーフウイルス分離株 205-1-4 Uy, 完全なゲノム) (登録番号: AF428057)]

【 0 0 6 2 】

ホップ矮化ウイルス (HSVd) [HSVd.h1 (日本型株) (登録番号: X00009(emb1), 60684(gi)); HSVd.h2 (日本株, 変異体2) (Leeら Nucleic Acids Res. 16, 8708-8708 (1988)); HSVd.h3 (韓国株) (登録番号: X12537(emb1), 60421(gi)); HSVd.g1 (ブドウウイルス (GVVd), 分離株 SHV-g(GV)) (登録番号: M35717(gb), 325405(gi)); HSVd.g2 (株: ドイツ栽培変種 Riesling) (登録番号: X06873(emb1), 60422(gi)); HSVd.g3 (株: Vitis vinifera Rootstock 5BBから分離) (登録番号: X15330(emb1), 60648(gi)); HSVd.g4 (ブドウ分離株 (HSVdg), 変異体 Ia) (登録番号: X87924(emb1), 897764(gi)); HSVd.g5 (ブドウ分離株 (HSVdg), 変異体 Ib) (登録番号: X87923(emb1), 897765(gi)); HSVd.g6 (ブドウ分離株 (HSVdg), 変異体 Ic) (登録番号: X87925(emb1), 897766(gi)); HSVd.g7 (ブドウ分離株 (HSVdg), 変異体 Id) (登録番号: X87926(emb1), 897767(gi)); HSVd.g8 (ブドウ分離株 (HSVdg), 変異体 Ie) (登録番号: X87927(emb1), 897768(gi)); HSVd.g9 (ブドウ分離株 (HSVdg), 変異体 IIa) (登録番号: X87928(emb1), 897769(gi)); HSVd.cit1 (変異体1, 分離株 HSV-cit) (登録番号: X06718(emb1), 60646(gi)); HSVd.cit2 (変異体2, 分離株 HSV-cit) (登録番号: X06719(emb1), 60647(gi)); HSVd.cit3 (HSV.カンキツ) (登録番号: X13838(emb1), 60418(gi)); HSVd.cit4 (登録番号: U02527(gb), 409021(gi)); HSVd.cit5 (Hsuら Virus Genes 9, 193-195 (1995)); HSVd.cit6 cit5 (Hsuら Virus Genes 9, 193-195 (1995)); HSVd.cit7 (分離株 CVd-IIaまたはE819) (登録番号: AF131248(gb)); HSVd.cit8 (分離株 CVd-IIbまたはCa902) (登録番号: AF131249(gb)); HSVd.cit9 (分離株 CVd-IIcまたはCa905) (登録番号: AF131250(gb)); HSVd.cit10 (分離株 Ca903) (登録番号: AF131251(gb)); HSVd.cit11 (分離株 CA909) (登録番号: AF131252(gb)); HSVd.cit12 (悪液質(cachexia)分離株 X-701-M) (登録番号: AF213483(gb), 12082502(gi)); HSVd.cit13 (悪液質分離株 X-701-1) (登録番号: AF213484(gb), 12082503(gi)); HSVd.cit14 (悪液質分離株 X-701-2) (登録番号: AF213485(gb), 12082504(gi)); HSVd.cit15 (悪液質分離株 X-701-3) (登録番号: AF213486(gb), 12082505(gi)); HSVd.cit16 (悪液質分離株 X-704-M) (登録番号: AF213487(gb), 12082506(gi)); HSVd.cit17 (悪液質分離株 X-704-1) (登録番号: AF213488(gb), 12082507(gi)); HSVd.cit18 (悪液質分離株 X-704-2) (登録番号: AF213489(gb), 12082508(gi)); HSVd.cit19 (悪液質分離株 X-704-3) (登録番号: AF213490(gb), 12082509(gi)); HSVd.cit20 (悪液質分離株 X-707-M) (登録番号: AF213491(gb), 12082510(gi)); HSVd.cit21 (悪液質分離株 X-707-1) (登録番号: AF213492(gb), 12082511(gi)); HSVd.cit22 (悪液質分離株 X-707-2) (登録番号: AF213493(gb), 12082512(gi)); HSVd.cit23 (悪液質分離株 X-707-3) (登録番号: AF213494(gb), 12082513(gi)); HSVd.cit24 (悪液質分離株 X-707-4) (登録番号: AF213495(gb), 12082514(gi)); HSVd.cit25 (悪液質分離株 X-712-M) (登録番号: AF213496(gb), 12082515(gi)); HSVd.cit26 (悪液質分離株 X-712-1) (登録番号: AF213497(gb), 12082516(gi)); HSVd.cit27 (悪液質分離株 X-712-2) (登録番号: AF213498(gb), 12082517(gi)); HSVd.cit28 (悪液質分離株 X-712-3) (登録番号: AF213499(gb), 12082518(gi)); HSVd.cit29 (悪液質分離株 X-715-M) (登録番号: AF213500(gb), 12082519(gi)); HSVd.cit30 (悪液質分離株 X-715-1) (登録番号: AF213501(gb), 12082520(gi)); HSVd.cit31 (悪液質分離株 X-715-2) (登録番号: AF213502(gb), 12082521(gi)); HSVd.cit32 (CVd-IIa (117)) (登録番号: AF213503(gb), 12082522(gi)); HSVd.cit33 (分離株 CVd-IIa 17uy) (登録番号: AF359276(gb), 13991644(gi)); HSVd.cit34 (分離株 CVd-IIa 11uy) (登録番号: AF359275(gb), 13991643(gi)); HSVd.cit35 (分離株 CVd-IIa 10uy) (登録番号: AF359274(gb), 13991642(gi)); HSVd.cit36 (分離株 CVd-Ib 10uy) (登録番号: AF359273(gb)

, 13991641(gi)); HSVd.cit37 (分離株 CVd-Ib 5uy) (登録番号: AF359272(gb), 13991640(gi)); HSVd.cit38 (分離株 CVd-Ib 3uy) (登録番号: AF359271(gb), 13991639(gi)); HSVd.cit39 (分離株 CVd-Ib 2uy) (登録番号: AF359270(gb), 13991638(gi)); HSVd.cit40 (分離株 CVd-IIa) (登録番号: X69519(emb1), 2369773(gi)); HSVd.cit41 (分離株 CVd-IIb) (登録番号: X69518(emb1), 2369774(gi)); HSVd.cit42 (分離株 CVd-IIa 54-2-1) (登録番号: AF416554, 15811645(gi)); HSVd.cit43 (分離株 CVd-IIa 54-2-2) (登録番号: AF416555, 15811646(gi)); HSVd.cit44 (分離株 CVd-IIa 205-2-4) (登録番号: AF416556, 15811647(gi)); HSVd.cit45 (分離株 CVd-IIa 205-2-1) (登録番号: AF416557, 15811648(gi)); HSVd.p1 (HSV-peach (A9)) (登録番号: D13765(dbj), 221254(gi)); HSVd.p2 (HSV-plumおよびHSV-peach (AF) 分離株) (登録番号: D13764(dbj), 221255(gi)); HSVd.p3 (スペインからのcv. Jeronimo J-16) (登録番号: Y09352(emb1), 1684696(gi)); HSVd.apr1 (フランスからのcv. Rouge de Roussillon) (登録番号: Y08438(emb1), 2462494(gi)); HSVd.apr2 (スペインからの不明の栽培変種) (登録番号: Y08437(emb1), 2462495(gi)); HSVd.apr3 (スペインからのcv. Bulida) (登録番号: Y09345(emb1), 1684690(gi)); HSVd.apr4 (スペインからのcv. Bulida) (登録番号: Y09346(emb1), 1684691(gi)); HSVd.apr5 (スペインからのcv. Bulida d'Arques) (登録番号: Y09344(emb1), 1684692(gi)); HSVd.apr6 (スペインからのcv. Pepito del Rubio) (登録番号: Y09347(emb1), 1684697(gi)); HSVd.apr7 (スペインからのcv. Pepito del Rubio) (登録番号: 09348(emb1), 1684699(gi)); HSVd.apr8 (スペインからのcv. Pepito del Rubio) (登録番号: Y09349(emb1), 684698(gi)); HSVd.apr9 (モロッコからのcv. Canino) (登録番号: AJ297825(gb), 10944963(gi)); HSVd.apr10 (モロッコからのcv. Canino) (登録番号: AJ297826(gb), 10944964(gi)); HSVd.apr11 (モロッコからのcv. Canino) (登録番号: AJ297827(gb), 10944965(gi)); HSVd.apr12 (モロッコからのcv. Canino) (登録番号: AJ297828(gb), 10944966(gi)); HSVd.apr13 (モロッコからのcv. Canino) (登録番号: AJ297829(gb), 10944967(gi)); HSVd.apr14 (トルコからのcv. Septik) (登録番号: AJ297830(gb), 10944968(gi)); HSVd.apr15 (キプロスからのcv. Monaco bello) (登録番号: AJ297831(gb), 10944969(gi)); HSVd.apr16 (キプロスからのcv. Cafona) (登録番号: AJ297832(gb), 10944970(gi)); HSVd.apr17 (キプロスからのcv. Cafona) (登録番号: AJ297833(gb), 10944971(gi)); HSVd.apr18 (キプロスからのcv. Boccuccia spinosa) (登録番号: AJ297834(gb), 10944972(gi)); HSVd.apr19 (キプロスからのcv. Palumella) (登録番号: AJ297835(gb), 10944973(gi)); HSVd.apr20 (キプロスからのcv. Palumella) (登録番号: AJ297836(gb), 10944974(gi)); HSVd.apr21 (キプロスからのcv. Canino) (登録番号: AJ297837(gb), 10944975(gi)); HSVd.apr22 (ギリシャからのcv. Kolioponlou) (登録番号: AJ297838(gb), 10944976(gi)); HSVd.apr23 (ギリシャからのcv. Bebecou Paros) (登録番号: AJ297839(gb), 10944977(gi)); HSVd.apr24 (ギリシャからのcv. Bebecou Paros) (登録番号: AJ297840(gb), 10944978(gi)); HSVd.c1 (キュウリペールフルーツウイロイド(Cucumber pale fruit viroid) (CPFVd), 分離株 HSV-cucumber) (登録番号: X00524(emb1), 60644(gi)); HSVd.c2 ((キュウリペールフルーツウイロイド (CPFVd)) (登録番号: X07405(emb1), 59015(gi)); HSVd.alm1 (登録番号: AJ011813(emb), 3738118(gi)); HSVd.alm2 (登録番号: AJ011814(emb), 3738119(gi)); HSVd.カンキツウイロイドII, 完全なゲノム (登録番号: AF434679)]. これらのヌクレオチド配列のすべてを参照により本明細書中に組み入れるものとする。

【0063】

上記リストからも直ちに明らかとなるように、ウイロイドは非常に配列変化を起こしやすいが、そのような天然の変異体も、それらが機能的に連結されたRNAと共に核に輸送される能力を保持するかぎり、本発明の方法および手段に使用することができる。

【0064】

ウイロイドヌクレオチド配列の天然の改変に加えて、特定のヌクレオチドの置換、欠失または付加によっても変異体を得ることができ、かかる変異体も、それらが機能的に連結されたRNAと共に核に輸送される能力を保持するかぎり、本発明の方法および手段に使用

10

20

30

40

50

することができる。

【0065】

さらに、機能的に連結されたRNAと共に核に輸送され得るウイロイドヌクレオチド配列由来のより小さなRNA領域およびその変異体も、本発明において使用することができる。

【0066】

植物細胞などの宿主細胞の核に輸送されるウイロイドヌクレオチド配列由来の小領域および変異体の能力は、Zhouら, 2001, J. Gen Virology, 82, 1491-1497に記載のアッセイを用いて調べることができる。簡単に説明すると、このアッセイは、宿主細胞の細胞質において複製するウイルスRNAベクターを用いて、マーカー遺伝子のコード領域中に介在配列を含むマーカーコード領域（例えば、GFP）を宿主細胞に導入することを含む。機能的な核局在化シグナルが導入される（有利には、介在配列中に挿入される）と、マーカー遺伝子を含むウイルスRNAベクターは核に移され、そこでイントロンが除去されて、スプライシングされたRNAが細胞質に戻される。スプライシングされたRNAは、GFPタンパク質への翻訳により、ならびにスプライシングされたRNA分子からのイントロンの不在を確かめるRNA分析法（例えば、RT-PCR）により検出することができる。

10

【0067】

さらに、ヒト肝炎デルタRNAは、核に局在化されて棒状構造を形成するという点でPSTVd型のウイロイドに非常に似ている1700 ntの一本鎖環状RNAであり、これも本発明に従って使用することができる。

【0068】

本発明の別の実施形態においては、大部分が二本鎖のRNA領域はCUG、CAG、GACまたはGUC繰返しを含む。本明細書中で用いる「トリヌクレオチド繰返し」あるいは「CUG、CAG、GACまたはGUC繰返し」とは、いくつかのCUG、CAG、GACまたはGUCトリヌクレオチドを含むRNA分子のことである。好ましくは、CUGトリヌクレオチドは介在配列なしで繰り返されるが、CUGトリヌクレオチドで構成されない1から20~30ヌクレオチドの短い領域がCUGトリヌクレオチド繰返し間に存在してもよい。好ましくは、CUG繰返しは35コピーまたは44コピーを超えた数（例えば、50コピーと2000コピーの間の任意の数）のCUGトリヌクレオチドを含む。有利には、CUGトリプレットのコピー数は100または150を超えないほうがよい。CAG、GACまたはGUC繰返しも同様に使用できると予想される。

20

【0069】

本発明を特定の作用様式に限定するつもりはないが、このようなトリヌクレオチド繰返しは不完全な塩基対合によって棒状構造を形成し、この棒状構造が（おそらくは核膜孔からのRNA輸送を立体的に阻止することによって）核保持シグナルとして機能すると同時に、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼPKRを活性化すると考えられる [Davisら, 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 7388-7393; Tianら, 2000 RNA 6, 79-87; KochおよびLefert 1998 J. Theor. Biol. 192, 505-514]。

30

【0070】

CUG繰返しを含むRNA分子が、後述するように、例えば当該RNAをコードするキメラ遺伝子の転写により、宿主細胞の核に送達される場合、かかるCUG繰返しはアンチセンス介在遺伝子サイレンシングの効率を高めるのに特に適している。

40

【0071】

PSTVd型ウイロイド由来の核局在化シグナルまたはトリヌクレオチド繰返しのような、大部分が二本鎖のRNA領域は、標的的特異的アンチセンスRNAの3'末端に位置づけることが有利であるが、大部分が二本鎖のRNA領域の位置はあまり重要ではないと予想される。それゆえ、大部分が二本鎖のRNA領域はRNA分子の5'末端に存在してもよく（好ましくは、3'末端）、そのようなRNA分子の中央部にさえ存在してもよい。

【0072】

また、予期せざることに、遺伝子発現のアンチセンス介在ダウンレギュレーションは、大部分が二本鎖のRNA領域にアンチセンスRNAが機能的に連結されている場合、宿主細胞に供給されるRNA分子中にイントロン配列を含めることによってさらに増強しうることがわ

50

かった。この場合も、RNA分子中の標的特異的ヌクレオチド配列および大部分が二本鎖のRNA領域の双方に対するイントロンの位置は、効率にほとんど影響を与えないと予想される。事実、大部分が二本鎖のRNA領域をイントロン配列内に位置づけることができると考えられる。

【0073】

本明細書中で用いる「イントロン」または介在配列とは、より大きな転写DNA内のDNA領域をさすために用いられ、このDNA領域が核内で転写されると、より大きなRNAの一部であるRNA領域が生成されるが、イントロン配列に対応するこのRNA領域は、細胞質に移行するとき、より大きなRNAから取り除かれる。対応するRNAもイントロンまたは介在配列と称される。イントロン配列はスプライシング部位によって挟まれた配列であり、合成イントロンを作製するには、適切な分枝点を有する基本的に任意の配列に適切なスプライス部位を結合させる。5' UTR、コード領域または3' UTR内に位置するイントロンまたは介在配列を使用することが可能である。

10

【0074】

介在配列またはイントロンは好ましくは宿主真核細胞内でスプライシングされるべきであるが、(例えば、それらのガイド配列が改変されているか、または突然変異を起こしているため)もはやスプライシングされない介在配列の存在が、標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするキメラRNA分子の効率をさらに高めることさえある。本発明の一実施形態では、イントロンは双子葉植物フラベリア・トリネルビア (*Flaveria trinervia*) のピルビン酸・リン酸ジキナーゼ2イントロン2 (pdk2イントロン) と配列が実質的に同一であり、配列番号9の配列を含みうる。植物イントロンの他の例としては、トウゴマ (*Castor bean*) 由来のカタラーゼイントロン (登録番号AF274974)、ワタ由来のデルタ12デサチユラーゼ (Fad2) イントロン (登録番号AF331163)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis*) 由来のデルタ12デサチユラーゼ (Fad2) イントロン (登録番号AC069473)、トウモロコシ由来のユビキチンイントロン (登録番号S94464)、イネ由来のアクチンイントロンが挙げられる。哺乳動物ウイルスイントロンのその他の例には、SV40由来のイントロンが含まれる。真菌イントロンの例には、アスペルギルス (*Aspergillus*) 由来のトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子由来のイントロンがある。

20

【0075】

また、予期せざることに、真核生物の細胞中にすでに存在するアンチセンスRNA分子の標的遺伝子特異的領域に対応する標的遺伝子特異的領域を有するセンスRNA分子をさらに導入すると、標的遺伝子の発現のダウンレギュレーションの効率がさらに高まることを見出された。標的遺伝子の発現のダウンレギュレーションの同じ効率が、本明細書に記載するような大部分が二本鎖のRNA領域と共にセンスRNA分子を供給したときに観察された。センスRNA分子は、そのセンスRNA分子との塩基対合により二本鎖領域を形成することができるアンチセンスRNA分子と同時に、真核宿主生物の細胞に供給された。

30

【0076】

したがって、本発明の別の実施形態では、真核生物の細胞における標的遺伝子の発現をダウンレギュレーションするための方法が提供され、この方法は、以下のステップ：

a) 真核生物の細胞に第1および第2のキメラRNA分子を供給すること、ただし、

40

i) 第1のキメラRNA分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

ii) 第2のキメラRNA分子は、第1のキメラRNA分子の相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンス標的遺伝子特異的RNA領域を含むこと、

iii) 第1および第2のキメラRNAは、少なくとも、第1のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドと第2のキメラRNAの前記19個連続したヌクレオチドの間で塩基対合することができること、

50

iv) ここにおいて、第1または第2のキメラRNA分子のいずれかが、前記アンチセンス標的的特異的RNA領域または前記センス標的的特異的RNA領域に機能的に連結された、大部分が二本鎖のRNA領域を含むこと、

b) 標的遺伝子の発現がダウンレギュレーションされている真核生物を同定すること、を含んでなる。

【0077】

別の特定の実施形態においては、第1および第2の両キメラRNA分子は大部分が二本鎖の領域を含む。大部分が二本鎖のRNA領域および標的遺伝子特異的アンチセンスRNAの特定の実施形態は本明細書に記載したとおりである。センスRNA領域の特定の実施形態はアンチセンスRNA領域の特定の実施形態と同様である。

10

【0078】

有利には、本明細書に記載するような大部分が二本鎖のRNA領域を含むアンチセンスまたはセンスRNA分子は、キメラ遺伝子（その転写により、そのようなアンチセンスまたはセンスRNAがもたらされる）の導入と起こりうる組込みにより、真核宿主細胞または生物に供給される。したがって、本発明は、そのようなキメラ遺伝子を提供することも目的にしており、かかるキメラ遺伝子は、

- 対象の真核生物の細胞において発現され得るプロモーターまたはプロモーター領域と、これに機能的に連結された、転写されたときアンチセンスRNA分子をもたらすDNA領域、ただし、前記アンチセンスRNA分子は、

- 標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドの相補体に対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドの標的遺伝子特異的アンチセンスヌクレオチド配列、または

20

- 標的遺伝子のヌクレオチド配列からの19個連続したヌクレオチドに対して少なくとも約94%の配列同一性を有する少なくとも約19個連続したヌクレオチドの標的遺伝子特異的センスヌクレオチド配列と、これに機能的に連結された、

- 本明細書に記載するような、大部分が二本鎖のRNA領域、を含むものであること、および、場合により、

- 選択した真核細胞に適した転写終結およびポリアデニル化領域、を含んでなる。

【0079】

本明細書中で用いる「プロモーター」という用語は、転写開始時にDNA依存性RNAポリメラーゼにより認識されて、それと直接または間接的に結合するDNAをさす。プロモーターは、転写開始部位と、転写開始因子およびRNAポリメラーゼのための結合部位を含み、また、遺伝子発現調節タンパク質が結合しうる他の部位（例えば、エンハンサー）を含んでいてもよい。

30

【0080】

本明細書中で用いる「調節領域」という用語は、所定のDNA配列（例えば、タンパク質またはポリペプチドをコードするDNA）の転写を駆動し、かつその転写のタイミングおよびレベルを制御（すなわち、調節）することに関与しているDNAをさす。例えば、5'調節領域（または「プロモーター領域」）はコード配列の上流（すなわち、5'側）に位置するDNA配列であって、プロモーターと5'-非翻訳リーダー配列を含んでいる。3'調節領域はコード配列の下流（すなわち、3'側）に位置するDNA配列であって、1以上のポリアデニル化シグナルをはじめとする適当な転写終結（および/または調節）シグナルを含んでいる。

40

【0081】

本発明の一実施形態において、プロモーターは構成的プロモーターである。本発明の別の実施形態では、プロモーター活性が外部または内部刺激により増強され（誘導プロモーター）、かかる刺激として、例えばホルモン、化学物質、機械的衝撃、非生物的または生物的ストレス条件があるが、これらに限らない。また、プロモーターの活性は時間的または空間的にも調節することが可能である（組織特異的プロモーター；発生的に調節される

50

プロモーター)。

【0082】

本発明の特定の実施形態において、プロモーターは植物発現可能プロモーターである。本明細書中で用いる「植物発現可能プロモーター」とは、植物細胞内で転写を制御(開始)することができるDNA配列を意味する。これには植物由来のあらゆるプロモーターが含まれるが、植物細胞内で転写を指令することができる非植物由来のプロモーターも含まれる。すなわち、ウイルスまたは細菌由来のいくつかのプロモーター、例えばCaMV35S (Hapsterら, 1988)、地下性クローバーウイルスプロモーターNo4もしくはNo7(W09606932)、またはT-DNA遺伝子プロモーターも含まれ、さらに組織特異的または器官特異的プロモーター、例えば種子特異的プロモーター(例えば、W089/03887)、器官原基特異的プロモーター(Anら, 1996)、茎特異的プロモーター(Kellerら, 1988)、葉特異的プロモーター(Hudspethら, 1989)、葉肉特異的プロモーター(例えば、光誘導性Rubiscoプロモーター)、根特異的プロモーター(Kellerら, 1989)、塊茎特異的プロモーター(Keilら, 1989)、維管束組織特異的プロモーター(Pelemanら, 1989)、雄しべ選択的プロモーター(W089/10396, W092/13956)、裂開帯(dehiscence zone)特異的プロモーター(W097/13865)なども含まれる。

10

【0083】

本発明の別の特定の実施形態において、プロモーターは真菌発現可能プロモーターである。本明細書中で用いる「真菌発現可能プロモーター」とは、真菌細胞内で転写を制御(開始)することができるDNA配列を意味し、例えば、*A. nidulans* trpC遺伝子プロモーターまたは誘導性*S. cerevisiae* GAL4プロモーターなどがあるが、これらに限らない。

20

【0084】

本発明のさらに別の特定の実施形態において、プロモーターは動物発現可能プロモーターである。本明細書中で用いる「動物発現可能プロモーター」とは、動物細胞内で転写を制御(開始)することができるDNA配列を意味し、例えば、SV40後期および初期プロモーター、サイトメガロウイルスCMV-IEプロモーター、RSV-LTRプロモーター、SCSVプロモーターなどがあるが、これらに限らない。

【0085】

本発明に有用なアンチセンスまたはセンスRNA分子はまた、*in vitro*転写によっても作製することができる。このために、本発明によるキメラ遺伝子のプロモーターは、バクテリアファージの単一サブユニットRNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターであってよく、例えば、大腸菌ファージT7、T3、I、II、W31、H、Y、A1、122、cro、C21、C22、およびC2; シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)ファージgh-1; ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)ファージSP6; レイ菌(*Serratia marcescens*)ファージIV; シトロバクター(*Citrobacter*)ファージVIII; およびクレブシエラ(*Klebsiella*)ファージNo.11に由来するRNAポリメラーゼが含まれる [Hausmann, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 75: 77-109 (1976); Korstenら, *J. Gen Virol.* 43: 57-73 (1975); Dunnら, *Nature New Biology*, 230: 94-96 (1971); Towleら, *J. Biol. Chem.* 250: 1723-1733 (1975); Butler and Chamberlin, *J. Biol. Chem.*, 257: 5772-5778 (1982)]。このようなプロモーターの例は、それぞれT3 RNAポリメラーゼ特異的プロモーターおよびT7 RNAポリメラーゼ特異的プロモーターである。CIG中の第1プロモーターとして用いられるT3プロモーターは、McGrawら, *Nucl. Acid Res.* 13: 6753-6766 (1985)に記載されるT3遺伝子のいずれかのプロモーターでありうる。あるいはまた、T3プロモーターは、T3 RNAポリメラーゼにより認識されるようにヌクレオチド位置-10、-11および-12で改変されたT7プロモーターでありうる [Klementら, *J. Mol. Biol.* 215, 21-29(1990)]。好ましいT3プロモーターは、米国特許第5,037,745号に記載されるように、T3プロモーターの「コンセンサス」配列を有するプロモーターである。T7 RNAポリメラーゼと組み合わせて、本発明に従って使用しうるT7プロモーターは、DunnおよびStudier, *J. Mol. Biol.* 166: 477-535 (1983)に記載されるようなT7遺伝子のうちの1つの遺伝子のプロモーターを含む。好ましいT7プロモーターは、DunnおよびStudier(前掲)に記載されるように、T7プロモーター

30

40

50

の「コンセンサス」配列を有するプロモーターである。

【0086】

アンチセンスまたはセンスRNAは、アクセプターベクターDNAを適当なバクテリオファージ単一サブユニットRNAポリメラーゼと、当業者に公知の条件下で、接触させることにより大量に作製することができる。そのようにして作製したアンチセンスまたはセンスRNAは、その後、植物細胞、真菌細胞または動物細胞のような、遺伝子サイレンシングを起こしやすい細胞に送達するために使用される。アンチセンスRNAはリボソームや他のトランスフェクション試薬（例えば、ClonTechからのClonfectionトランスフェクション試薬またはCalPhos哺乳動物トランスフェクションキット）により動物細胞に導入することができ、適当な標的遺伝子をサイレンシングすることによって、ヒトをはじめとする動物の治療方法に使用できると考えられる。アンチセンスまたはセンスRNAはいくつかの異なる方法で細胞に導入することができる。例えば、マイクロインジェクション、アンチセンスまたはセンスRNAを被覆した粒子による衝撃、アンチセンスまたはセンスRNAの溶液中への細胞または生物の浸漬、アンチセンスまたはセンスRNAの存在下での細胞膜のエレクトロポレーション、アンチセンスまたはセンスRNAのリボソーム介在送達、リン酸カルシウムのような化学物質が介在するトランスフェクション、ウイルス感染、形質転換などによりアンチセンスまたはセンスRNAを導入しうる。細胞によるRNAの取込みを高めたり、アニーリングした鎖を安定化したり、あるいは他の方法で標的遺伝子の阻害を増大する成分と共に、アンチセンスまたはセンスRNAを導入してもよい。完全な動物の場合には、アンチセンスまたはセンスRNAを生物の内腔または間隙に注入または灌流することにより、あるいは

10

20

【0087】

アンチセンスまたはセンスRNAを生産することができる本発明のキメラ遺伝子は、特定の原核生物宿主でのアンチセンスまたはセンスRNAの発現に適した、任意の原核生物プロモーターを備えていてもよい。原核生物宿主は、線虫や昆虫のような動物（標的遺伝子のサイレンシングを想定して、それをリポーター遺伝子の発現低下によりモニタリングする）に該原核生物を摂取させることにより、アンチセンスおよび/またはセンスRNAの供給源として使用することができる。この場合には、標的遺伝子とリポーター遺伝子は標的真核生物の細胞内に存在する遺伝子であって、原核生物宿主の細胞内には存在すべきでないことが明らかだろう。こうして、本発明のアンチセンスおよびセンスRNA、あるいはこの種のアンチセンスまたはセンスRNA分子をもたらす得るキメラ遺伝子は、1つの宿主生物において産生させて、別の標的生物に（例えば、摂取、経口投与により、裸のDNAもしくはRNA分子として、リボソームに封入して、ウイルス粒子もしくは弱毒ウイルス粒子に挿入して、または不活性粒子上に被覆して）投与し、その別の生物において1以上の標的遺伝子の発現低下を起こすことができる。

30

【0088】

適切な転写終結およびポリアデニル化領域としては、限定するものではないが、SV40ポリアデニル化シグナル、HSV TKポリアデニル化シグナル、Agrobacterium tumefaciensのノパリンシンターゼ遺伝子ターミネーター、CaMV 35S転写産物のターミネーター、地下性矮化クローバーウイルス(subterranean stunt clover virus)のターミネーター、Aspergillus nidulans trpC遺伝子のターミネーターなどが挙げられる。

40

【0089】

本発明はさらに、これらのキメラ遺伝子からの転写により得ることができ、本発明による方法に有用であるアンチセンスおよびセンスRNA分子を提供することを目的とする。

【0090】

本発明の別の目的は、本発明のアンチセンスRNA分子を含有するか、または本発明のアンチセンスRNA分子をもたらすことができるキメラ遺伝子を含有する、真核細胞ならびに非ヒト真核生物を提供することである。好ましい実施形態では、キメラ遺伝子が真核生物

50

の細胞のゲノムに安定して組み込まれる。

【0091】

本発明の目的はまた、センスおよびアンチセンスRNA分子（そのうちの一方または両方のRNA分子は大部分が二本鎖のRNA領域を含む）を同時に含有するか、またはそのようなRNA分子をコードするキメラ遺伝子を含有する、真核細胞ならびに非ヒト真核生物を提供することである。

【0092】

別の実施形態において、本発明のキメラ遺伝子は、真核生物の細胞内で自律複製が可能なDNA分子（例えば、ウイルスベクター）上に担持させることができる。また、キメラ遺伝子またはアンチセンスもしくはセンスRNAを真核生物の細胞に一過性に保持させてもよい。

10

【0093】

キメラ遺伝子（またはRNA分子）の宿主細胞への導入は、さまざまな方法により行うことができ、こうした方法には、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクトイル法(microprojectile bombardment)、核へのマイクロインジェクションなどがある。

【0094】

キメラ遺伝子の植物細胞への導入方法は当技術分野で周知であり、アグロバクテリウム介在形質転換、粒子銃送達、マイクロインジェクション、インタクトな細胞のエレクトロポレーション、ポリエチレングリコールによるプロトプラスト形質転換、プロトプラストのエレクトロポレーション、リボソームによる形質転換、シリコン-ウィスカー(silicon-whisker)介在形質転換などが含まれる。このようにして得られた形質転換細胞を、その後、繁殖可能な成熟植物へと再生することができる。

20

【0095】

トランスジェニック動物は、キメラ遺伝子を受精した卵母細胞の前核に注入したり、細胞（好ましくは、未分化の細胞）を発生中の胚に移植してキメラ胚を作製したり、組換え細胞からの核を除核した胚または活性化卵母細胞に移植したりすることにより作製することができる。トランスジェニック動物の作製方法は当技術分野で十分に確立されており、米国特許第4,873,191号；Rudolphら 1999 (Trends Biotechnology 17:367-374)；Dalrympleら (1998) Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 15: 33-49；Colman (1998) Bioch. Soc. Symp. 63: 141-147；Wilmutら (1997) Nature 385: 810-813；Wilmutら (1998) Reprod. Fert. Dev. 10: 639-643；Perryら (1993) Transgenic Res. 2: 125-133；Hoganら Manipulating the Mouse Embryo, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1994、ならびにそこに引用された文献を参照されたい。

30

【0096】

従来の育種法で生産される、本発明のキメラ遺伝子を含む植物または動物の配偶子、種子、胚、子孫、ハイブリッドも本発明の範囲内に含まれる。

【0097】

本明細書に記載する方法および手段は、遺伝子サイレンシングが起こるどのような真核生物にも適用することができ、かかる生物としては、とりわけ、植物（トウモロコシ、コムギ、ジャガイモ、ヒマワリ、シバ、オオムギ、ライムギ、トマト、サトウキビ、ベニバナ、ワタ、シロイヌナズナ、イネ、アブラナ属植物、野菜、ダイズ、タバコ、樹木、アマ、ヤシ、落花生、マメ類など）、無脊椎動物（例えば、昆虫、甲殻動物、軟体動物、エビ、カニ、ロブスターなど）、脊椎動物（例えば、魚、鳥類、哺乳動物、ヒト）、酵母および菌類が含まれ、これらに限定されない。

40

【0098】

以下の非限定的な実施例では、真核細胞内での標的遺伝子発現のアンチセンスRNA媒介サイレンシング、またはセンス/アンチセンスRNA組合せにより媒介される標的遺伝子サイレンシングを増強するための方法および手段について記載する。

【0099】

50

実施例で特に断らないかぎり、全ての組換えDNA法は、Sambrookら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY、ならびにAusubelら (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USAの第1および2巻に記載されるような、標準的プロトコルに従って行われる。植物分子の研究のための標準的な材料および方法は、BIOS Scientific Publications Ltd (UK) とBlackwell Scientific Publications, UKから共同で発行された、R.D.D. Croyによる *Plant Molecular Biology Labfax* (1993)に記載されている。標準的な分子生物学技法に関するその他の文献としては、SambrookおよびRussell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY、ならびにBrown (1998) *Molecular Biology LabFax*, 第2版, Academic Press (UK)の第IおよびII巻が挙げられる。ポリメラーゼ連鎖反応に関する標準的な材料および方法は、DieffenbachおよびDveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press、およびMcPhersonら (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, 第1版, Springer Verlag, Germanyに見出すことができる。

【0100】

説明および実施例全体を通して、以下の配列を参照されたい：

- 配列番号1: RG1 PSTVdの増幅用のオリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号2: RG1 PSTVdの増幅用のオリゴヌクレオチドプライマー
- 配列番号3: PSTVd RG1のゲノムのヌクレオチド配列
- 配列番号4: オーストラリアブドウウイルスのゲノムのヌクレオチド配列 20
- 配列番号5: ココヤシチナンガイウイルスのゲノムのヌクレオチド配列
- 配列番号6: トマトプランタマチョウイルスのゲノムのヌクレオチド配列
- 配列番号7: ホップ潜在ウイルスのゲノムのヌクレオチド配列
- 配列番号8: トマト頂端矮化ウイルスのゲノムのヌクレオチド配列
- 配列番号9: pdk2イントロンのヌクレオチド配列
- 配列番号10: EIN2 cDNAのヌクレオチド配列
- 配列番号11: ゲノムEIN2クローンのヌクレオチド配列
- 配列番号12: 実施例に記載の構築物中で用いるEIN2部分の増幅用のオリゴヌクレオチドプライマー1
- 配列番号13: 実施例に記載の構築物中で用いるEIN2部分の増幅用のオリゴヌクレオチドプライマー2 30
- 配列番号14: pMBW491中のpTSVd配列
- 配列番号15: pMBW489中のpTSVd配列 (10ヌクレオチドの欠失を有する)。

【実施例】

【0101】

実施例1: 異なるキメラ遺伝子を含む異なる植物系統の作製

各種の構築物を用いて発現をダウンレギュレーションさせるための標的遺伝子の例として、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)由来のEIN2遺伝子を選択した。EIN2遺伝子発現のダウンレギュレーションは、種子をMS-ACC培養基 (アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC)を含む)上で発芽させ、暗室または光線のもとで生育させることにより、簡単に肉眼で観察することができる。暗室で生育させたEIN2サイレンス化苗は、野生型の苗と比べて、長い胚軸と発達した根系を有する。一方、光線のもとで生育させたEIN2サイレンス化苗は、その比較的大きい子葉によって野生型の苗と区別することができる (図3参照)。

【0102】

さまざまな構築物中でセンスまたはアンチセンス配向で使用されるEIN2ヌクレオチド配列はPCRで増幅したが、その際、配列番号12および13に示すヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、鋳型DNAとしてはゲノムDNA (ヌクレオチド配列については、配列番号11参照) またはcDNA (ヌクレオチド配列については、配列番号10参照) を使用した。ゲノムEIN2配列部分 (gEIN2)の増幅により、配列番号11の538位のヌクレオ

チドから1123位のヌクレオチドまでのヌクレオチド配列を有するPCR断片を取得したが、この断片はEIN2遺伝子の2つの天然のイントロンを含んでいた。

【0103】

gEIN2断片をKpnI/ClaI断片としてpART7 (Gleave, 1992 Plant. Mol. Biol. 20: 1203-1207)にクローニングしてpMBW313を取得し、35Sプロモーター-gEIN2_{sense}-OCS3'カセットをpART27 (Gleave 1992 前掲)にNotI部位でクローニングしてpMBW353を取得した。

【0104】

同様の断片(cEIN2)をPCRで増幅したが、鋳型としてEIN2 cDNA (配列番号10)を使用し、gEIN2の場合と同じプライマー対を使用した。cEIN2断片をBamHI/ClaIで消化し、pSHUTTLE (Wangら, 1998 Acta Hort. 461: 401-407)に同一部位でクローニングしてpMBW310を得た。次に、XbaIを用いてpMBW310からcEIN2断片を切り出し、pART7のXbaI部位にクローニングしてpMBW351を形成させた。この中間体ベクターから35S-EIN2アンチセンス-OCS3'カセットを切り出し、pWBVec2A (Wangら 1998, 前掲)にNotI部位でクローニングしてpMBW360を得た。

【0105】

PSTVd RG1株の全長配列(配列番号3)は、配列番号1および配列番号2のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを用いてcDNAから増幅した。得られたPCR断片をBglIIで消化し、pMBW313のBamHI部位にクローニングしてpMBW345を得、pMBW345から35S-gEIN2-PSTVd-OCS3'カセットを切り出して、pART27にNotI部位でクローニングするとpMBW355が得られた。

【0106】

pMBW359の場合は、PCR増幅したPSTVd配列をBglIIで消化し、pMBW310のBamHI部位にクローニングしてpMBW346を得、pMBW346からXbaIでcEIN2アンチセンス-PSTVd配列を切り出し、pHANNIBAL (Wesleyら 2001)のXbaI部位にクローニングしてpMBW349を形成した。次に、35S-pdk2-cEIN2アンチセンス-PSTVd-OCS3'カセットをpWBVec2aにNotI部位でクローニングしてpMBW359を形成した。cEIN2アンチセンスPSTVd断片もpWBVec2aにクローニングしてpMBW357を得た。

【0107】

EIN2 cDNA断片をpMBW310からEcoRV/BamHIで切り出し、Pfu処理して平滑末端とし、pKAN NIBAL (Wesleyら 2001)のBamHI部位(同様にPfu処理した)に連結させた。35Sプロモーターに対して両方の配向でcEIN2を有するプラスミドを回収し、pMBW401 (アンチセンス)およびpMBW404 (センス配向)と命名した。

【0108】

pLMW37、pLMW38、pLMW39およびpLMW40の場合は、cEIN2断片をPSTVd配列の逆方向繰返し配列の上流または下流にセンスまたはアンチセンス配向で挿入した。そのために、部分的PSTVd配列(配列番号3の16位のヌクレオチドから355位のヌクレオチドまで)をPSTVdゲノムの完全コピーに対して逆方向でpdkイントロンの上流にクローニングした。

いろいろな構築物の模式図を図2に示す。

【0109】

実施例2： 実施例1の異なるキメラ遺伝子を含むトランスジェニック・シロイヌナズナ系統におけるEIN2遺伝子発現の分析

図2に示すキメラ構築物を従来法によりアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)に導入し、得られたアグロバクテリウム株を用いて、キメラ遺伝子を浸漬法によりシロイヌナズナ生態型ランドバーク・エレクタ(*Landsberg erecta*)に導入した。選択薬剤として15 mg/L ヒグロマイシンまたは50 mg/Lカナマイシンを用いてトランスジェニック系統を選択した。T1 opr F1種子を集めて、EIN2サイレンシングをアッセイした。

【0110】

そのために、50 μMのACCを含むMS培養基に種子を播いた。プレートをパラフィルムでしっかりとシールし、光線のもとにまたは暗室に置いた。サイレンシングは、根と子葉の大

きさを観察することにより（光線のもとで保温）、あるいは根または胚軸の大きさを観察することにより（暗室で保温）評価した。EIN2サイレンス化系統においては、根または胚軸が同一条件下で生育させた野生型系統よりも著しく長くなり、また、子葉が顕著に大きくなる。

【0111】

初代形質転換体からの種子をMS-ACC培養基に播き、パラフィルムでシールし、4℃で0～2晩保持し、その後生育室に移して光線のもとにまたは暗室に置いた。EIN2遺伝子のサイレンシングは、（光線のもとで発芽するものについては）根と子葉の大きさを、（暗室で発芽するものについては）胚軸の大きさを調べることにより評価した。顕著なまたは強いサイレンシングでは根または胚軸が長くなり、弱いサイレンシングでは子葉が比較的大きくなるが、根または胚軸は短い。これらの結果を表1に要約する。

【表 1】

表 1： 種々の EIN2 構築物で形質転換したシロイヌナズナ植物における EIN2 サイレンシングの効率の要約

構築物	簡単な説明	トランスジェニックシステム	#強いサイレンシング	#弱いサイレンシング	サイレンシングの頻度
PMBW360	• EIN2 アンチセンス	23	2	5	30%
PMBW401	• EIN2 アンチセンス • Pdk イントロン	20	0	3	15%
PMBW357	• EIN2 アンチセンス • PSTVd	17	3	5	47%
PMBW359	• EIN2 アンチセンス • PSTVd • Pdk イントロン	22	10	6	73%
PMBW353	• EIN2 センス • 天然イントロン	19	2	3	26%
PMBW355	• EIN2 センス • 天然イントロン • PSTVd	17	1	1	12%
PMBW404	• EIN 2 センス • PDK イントロン	20	3	2	25%
PLMW37	• EIN2 センス • Pdk イントロン • PSTVd 繰返し	19	0	0	0
PLMW38	• EIN2 アンチセンス • Pdk イントロン • PSTVd 繰返し	10	1	2	30
PLMW39	• EIN2 センス • Pdk イントロン • PSTVd 繰返し	17	0	0	0
PLMW40	• EIN2 アンチセンス • Pdk イントロン • PSTVd 繰返し	20	2	5	35%

10

20

30

40

【0112】

実施例 3： 実施例 1 の異なるキメラ遺伝子を含むトランスジェニック・シロイヌナズナシステムの交雑により得られたシロイヌナズナシステムにおける EIN2 遺伝子発現の分析

シロイヌナズナシステム MBW353、MBW355、MBW359、MBW360 を他家受粉させることにより、センスおよびアンチセンス EIN2 構築物を同時に含む新システムを得た。これらの新システムを実施例

50

2に記載したのと同様の方法で分析した。結果を表2に要約する。トランスジーンの数なくとも一方がPSTVd配列を含んでいた植物は非常に効率よくサイレンシングされた。

【表2】

表2： センスおよびアンチセンス EIN2 構築物の様々な組合せを含むシロイヌナズナ植物における EIN2 サイレンシングの効率の要約

系統	簡単な説明	試験した系統の数	サイレンス化系統の数	サイレンシングの頻度
MBW353 X MBW360	<ul style="list-style-type: none"> • EIN2 センス • 天然イントロン および <ul style="list-style-type: none"> • EIN2 アンチセンス 	7	2	28.5%
MBW353 X MBW359	<ul style="list-style-type: none"> • EIN2 センス • 天然イントロン および <ul style="list-style-type: none"> • EIN2 アンチセンス • PSTVd • Pdk イントロン 	3	3	100%
MBW355 X MBW360	<ul style="list-style-type: none"> • EIN2 センス • 天然イントロン および <ul style="list-style-type: none"> • PSTVd • EIN2 アンチセンス 	5	4	80%
MBW355 X MBW359	<ul style="list-style-type: none"> • EIN2 センス • 天然イントロン および <ul style="list-style-type: none"> • PSTVd • EIN2 アンチセンス • PSTVd • Pdk イントロン 	11	9	81.8%

【0113】

実施例4： 哺乳動物細胞におけるGFP遺伝子の遺伝子サイレンシングを媒介するための様々なキメラ遺伝子の構築、ならびにCHO細胞における分析

哺乳動物細胞における発現をダウンレギュレーションさせるための標的遺伝子の例として、CMVプロモーター領域の制御下で発現されかつSV40ポリアダニル化シグナルが後に続くヒト化GFPコード領域を選択した(pCI-GFP)。

【0114】

GFPコード領域をCMVプロモーター領域に対してセンス方向(pMBW493、pMBW494およびpMBW497)またはアンチセンス方向(pMBW489、pMBW491またはpMBW496)のいずれかでクローニングした、様々な実験的サイレンシング構築物を作製した。

【0115】

プラスミドpMBW493およびpMBW489は、GFPコード領域の下流であってSV40ポリアダニル

化シグナルの上流に、10ヌクレオチドの欠失を有するPSTVd配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号15）を含んでいた。この欠失は予想された二次構造に影響を与える（図5参照）。

【0116】

プラスミドpMBW494およびpMBW491は、GFPコード領域の下流であってSV40ポリアダニル化シグナルの上流に、10ヌクレオチドの欠失を有しない配列番号14のPSTVd配列に対応するヌクレオチド配列を含んでいた。

【0117】

プラスミドpMBW497およびpMBW496は、GFPコード領域の下流であってSV40ポリアダニル化シグナルの上流に、60のCUGトリヌクレオチドの繰返しを含むヌクレオチド配列を含んでいた。

10

【0118】

異なる実験プラスミドを、GFP発現キメラ遺伝子を含むプラスミドと組み合わせてCHO細胞に（様々な濃度で）導入した（表3；エントリー1～18）。GFP構築物はセンス構築物中では機能的な配列であるため、これらの構築物単独によるGFP発現を調べるために、センスGFPを含む実験構築物を、余分のGFP発現キメラ遺伝子を用いないで、導入した（表3；エントリー19～30）。さらに、アンチセンスおよびセンス実験構築物の組合せを様々な濃度でCHO細胞に導入した（表3；エントリー31～42）。対照として、キメラGFP発現構築物（pCi-GFP）をCHO細胞に単独で導入した。

【0119】

24時間または48時間後、細胞をGFP発現について評価した。平均カウント数と標準偏差を表3に示す。

20

【0120】

pTSVdまたはCUG繰返し配列を保持しているアンチセンスGFP構築物pMBW491、pMBW496およびpMBW489は、GFP遺伝子の発現を顕著に低下させた。

【0121】

興味深いことに、PSTVd配列が10ヌクレオチドの欠失を含んでいるpMWB489は、インタクトなPSTVd配列を含むpMWB491よりもGFPサイレンシングが遅く、その程度が低かった。

【 表 3 】

	実験 DNA	標的 DNA	実験 DNA に関する注解	平均カ ウント (24 hr)	標準偏差	平均カ ウント (48 hr)	標準偏差
1	0.1µg pMBW89	0.3µg GFP	アンチセンス+PSTVd (欠失)	3626	206	9058	1468
2	0.3µg pMBW 89	0.3µg GFP		3521	41	6468	3522
3	0.7µg pMBW 89	0.3µg GFP		3167	1348	1096	2191
4	0.1µg pMBW 91	0.3µg GFP	アンチセンス+PSTVd	3585	86	5908	623
5	0.3µg pMBW 91	0.3µg GFP		748	128	1426	332.3
6	0.7µg pMBW 91	0.3µg GFP		23	25	1637	70
7	0.1µg pMBW 96	0.3µg GFP	アンチセンス+ CUG 繰返し	3217	467	5221	4700
8	0.3µg pMBW 96	0.3µg GFP		2907	107	3272	0
9	0.7µg pMBW 96	0.3µg GFP		181	92	1433	466
10	0.1µg pMBW 93	0.3µg GFP	センス + PSTVd (欠失)	5815	313	16482	470
11	0.3µg pMBW 93	0.3µg GFP		10453	1555	15810	1067
12	0.7µg pMBW 93	0.3µg GFP		12718	5423	10666	949
13	0.1µg pMBW 94	0.3µg GFP	センス+PSTVd	9166	1269	15023	263
14	0.3µg pMBW 94	0.3µg GFP		12719	3894	6699	94
15	0.7µg pMBW 94	0.3µg GFP		1009	658	13133	824
16	0.1µg pMBW 97	0.3µg GFP	センス+CUG 繰返し	6414	1367	15795	178
17	0.3µg pMBW 97	0.3µg GFP		3596	50	10235	770
18	0.7µg pMBW 97	0.3µg GFP		729	295	13171	2868
19	0.1µg pMBW 93	なし	センス + PSTVd (欠失)	1216	15	3692	142
20	0.3µg pMBW 93	なし		6022	1293	9341	273
21	0.5µg pMBW 93	なし		6795	3235	11466	2541
22	0.7µg pMBW 93	なし		12002	763	10316	1523
23	0.1µg pMBW 94	なし	センス+PSTVd	2121	594	5417	777
24	0.3µg pMBW 94	なし		5671	5096	9317	743
25	0.5µg pMBW 94	なし		6349	3253	7842	337
26	0.7µg pMBW 94	なし		1785	729	15574	2208
27	0.1µg pMBW 97	なし	センス+CUG 繰返し	4448	626	6064	289
28	0.3µg pMBW 97	なし		487	83	7767	194

【 0 1 2 2 】

10

20

30

40

	実験 DNA	標的 DNA	実験 DNA に関する注解	平均カ ウント (24 hr)	標準偏差	平均カ ウント (48 hr)	標準偏差
29	0.5µg pMBW 97	None		522	223	7481	566
30	0.7µg pMBW 97	None		270	159	8980	1154
31	0.1µg pMBW 93 + 0.1µg pMBW 91	なし	センス + PSTVd (欠失)	1189	148	2331	815
32	0.3µg pMBW 93 + 0.3µg pMBW 91	なし	アンチセンス+PSTVd	695	83	3101	533
33	0.5µg pMBW 93 + 0.5µg pMBW 91	なし		111	117	3758	1583
34	0.3µg pMBW 93 + 0.1µg pMBW 91	なし		1811	1304	5301	73
35	0.3µg pMBW 93 + 0.3µg pMBW 91	なし		312	171	4972	401
36	0.3µg pMBW 93 + 0.7µg pMBW 91	なし		14	20	2896	1075
37	0.1µg pMBW 97 + 0.1µg pMBW 96	なし	アンチセンス+CUG 繰返し	3841	929	2945	341
38	0.3µg pMBW 97 + 0.3µg pMBW 96	なし	センス+CUG 繰返し	1018	401	3236	822
39	0.5µg pMBW 97 + 0.5µg pMBW 96	なし		1262	241	6730	289
40	0.3µg pMBW 97 + 0.1µg pMBW 96	なし		3603	2785	10349	3463
41	0.3µg pMBW 97 + 0.3µg pMBW 96	なし		4903	1054	3453	2380
42	0.3µg pMBW 97 + 0.7µg pMBW 96	なし		278	46	5897	1899
43	なし	0.3µg GFP	対照	4780	688	25175	8289.6

表 3: 様々な実験構築物で形質転換した CHO 細胞における GFP 発現の要約.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0123】

【図1】 Mfoldソフトウェアを用いて推定された、PSTVd型のさまざまなウイロイドの二次構造を模式的に示す。A. ジャガイモスピンドルチューバーウイロイド; B. オーストラ

リアブドウウイルス；C. ココヤシチナンガウイルス；D. トマトプランタマチョーウイルス；E. 熱突然変異体T229のホップ潜在ウイルス；F. トマト頂端矮化ウイルス。

【図2】本明細書の実施例1~3において使用した各種のキメラ遺伝子構築物を模式的に示す。35S-P：CaMV 35Sプロモーター；Pdkイントロン：双子葉植物 *Flaveria trinervia* のピルビン酸・リン酸ジキナーゼ2イントロン2；cEIN2：シロイヌナズナ由来のEIN2遺伝子のcDNAコピー（エチレンに対する感受性のために必要な遺伝子；Alonsoら 1999 Science 284, 2148-2152）、この領域のプロモーターに対する配向は矢印で示してある；gEIN2：シロイヌナズナ由来のEIN2遺伝子のゲノムコピー；PSTVd：ジャガイモスピンドルチューバーウイルスのゲノムのcDNAコピー；PSTVd^{*}：PSTVdのインタクトなコピーに対して逆方向でクローニングされた、ヌクレオチド16からヌクレオチド355までのPSTVd由来の部分配列；OCS3'：アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来のオクトピンシンターゼ遺伝子の3'領域。

10

【図3】1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)の存在下で発芽させたときのEIN2サイレンス化植物の表現型。A. 暗室で；B. 光線条件下で。Wt：野生型植物。

【図4】実施例4において使用した各種のキメラ遺伝子構築物を模式的に示す。CMVプロモーター：サイトメガロウイルスプロモーター；SV40ポリ(A)：SV40由来の転写終結およびポリアデニル化領域；PSTVd：ジャガイモスピンドルチューバーウイルス配列；CUGrep：CUG配列の60回の繰返しを含む配列；humGFP：ヒト化緑色蛍光タンパク質コード領域（ヒト遺伝子のコドン使用頻度に適合させた；この領域のプロモーターに対する配向は矢印で示してある）。

20

【図5】pMBW491（A；ほぼ野生型の立体構造をとる）およびpMBW489（10ヌクレオチドの欠失が野生型の立体構造とは異なる構造をもたらす）中のpPSTVdの推定二次構造を模式的に示す。

【0124】

（配列表）

SEQUENCE LISTING

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization

<120> Modified gene-silencing RNA and uses thereof

<130> BROLGA-W01

<150> 60/363851

<151> 2002-03-14

<160> 15

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for the PCR amplification of the genome of PSTVd RG1

<400> 1

cgcagatctc ggaactaaac tcgtggttc

29

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for the PCR amplification of the genome of PSTVd RG1

<400> 2

gcgagatcta ggaaccaact gcggttc

27

<210> 3

<211> 359

<212> DNA

10

20

30

40

<213> Potato spindle tuber viroid

<400> 3

```

cggaaactaaa ctctgtgggtc ctgtgggttca cacctgacct cctgacaaga aaagaaaaaa    60
gaaggcggct  cggaggagcg cttcagggat ccccggggaa acctggagcg aactggcaaa    120
aaaggacggt  ggggagtgcc cagcggccga caggagtaat tcccgccgaa acagggtttt    180
cacccttctt  ttcttctgggt gtccttcttc gcgcccgcag gaccacctct cgcccccttt    240
gcgctgtcgc  ttcggctact acccggtgga aacaactgaa gctcccgaga accgcttttt    300
ctctatctta  cttgctccgg ggcgaggggtg tttagccctt ggaaccgcag ttggttctt    359

```

10

<210> 4

<211> 369

<212> DNA

<213> Australian grapevine viroid

<400> 4

```

tgggcaccaa ctagagggtc ctgtgggtact caccgaaggc cgcgaacgta ggaaagaaaa    60
agatagaaaa gctgggtaag actcacctgg cgactcgtcg tcgacgaagg gtctcagca    120
gagcaccggc  aggaggcgct atgcaggaac gctaggggtc ctccagcgga ggactgaaga    180
aactccggtt  tcttctttca ctctgtagct ggaatccctg ttgcgcttgc tggcgaacc    240
tgcaggaag  ctagctgggt cccgctagtc gagcggactc gtcccagcgg tccaaccag    300
ttttctttat cctatctttc ctgcggggcgc ccggtcgtgg ttaccctgga gtcctctgtt    360
tggaggccc                                     369

```

20

<210> 5

<211> 254

<212> DNA

<213> Coconut tinangaja viroid

30

<400> 5

```

ctggggaatt cccacggctc ggcaaaataa aagcacaaga gcgactgcta gagggatccc    60
cggggaaacc cctagcaacc gaggtagga gcgtacctgg tgcgcccgat tcgtgctggt    120
tgggcttcgt cccttccgag ctctgatccg acgcccggcc gcttcctcgc cgaagctgct    180
acggagacta cccgggtgat acaactcttt gcagcgcct gtgtaataaa agctcgagtc    240
cggtttgcgc ccct                                     254

```

<210> 6

<211> 360

<212> DNA

<213> Tomato planta macho viroid

40

<400> 6

```

cgggatcttt tccttgtggt tcctgtggta cacacctgac ctctgacca gaaaagaaaa    60

```

aagaattgcg gccaaaggag cgcttcaggg atccccgggg aaacctggag cgaactggcg 120
 aaggagtgc ggctggggag tctcccagac aggagtaatc cccgctgaaa cagggttttc 180
 acccttcctt tcttcgggtt tccttcctct gcggtegaca ccctcgcccg cttctcttgc 240
 gctgtcgctt cggagactac cgggtggaaa caactgaagc tccaagcgc cgctttttct 300
 ctatcttgct ggctccgggg cgagggtgga aaacctgga acccttcgaa aagggtccct 360

<210> 7

<211> 256

<212> DNA

<213> Hop latent viroid

10

<400> 7

ctggggaata cactacgtga cttacctgta tgatggcaag ggctcgaaga gggatccccg 60
 gggaaaccta ctcgagcgag gcggagatcg agcgcagtt cgtgcgcggc gacctgaagt 120
 tgcttcggct tcttcttggt cgcgtcctgc gtggaacggc tccttctcca caccagccgg 180
 agttggaaac tacccgggtg atacaactct tgagcgccga gctttacctg cagaagttca 240
 cataaaaagt gcccat 256

<210> 8

<211> 360

<212> DNA

<213> Tomato apical stunt viroid

20

<400> 8

cgggatcttt cgtgaggttc ctgtggtgct cacctgacct tgcaggcatc aagaaaaaag 60
 ataggagcgg gaaggaagaa gtccttcagg gatccccggg gaaacctgga ggaagtcgag 120
 gtcgggggct tcggatcatt cctgggtgag acaggagtaa tcccagctga aacagggttt 180
 tcacccttcc tttctcttgg tttccttctc ctgcgccgaa ggtcttcggc cctcgcccgg 240
 agcttctctc tggagactac cgggtggaaa caactgaagc ttccacttcc acgctctttt 300
 tctctatctt tgttgctctc cgggcgaggg tgaaagcccc tggaacctg aatgggtccct 360

30

<210> 9

<211> 786

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> nucleotide sequence of the pdk2 intron

40

<400> 9

aagcttggtgta aggaaataat tattttcttt tttcctttta gtataaaata gttaagtgat 60
 gttaattagt atgattataa taatatagtt gttataattg tgaaaaaata atttataaat 120
 atattgttta cataaacaac atagtaatgt aaaaaaatat gacaagtgat gtgtaagacg 180

aagaagataa	aagttgagag	taagtatatt	atTTTTaatg	aatttgatcg	aacatgtaag	240
atgatatact	agcattaata	tttgttttaa	tcataatagt	aattctagct	ggtttgatga	300
attaaatatac	aatgataaaa	tactatagta	aaaataagaa	taaataaatt	aaaataatat	360
ttttttatga	ttaatagttt	attatataat	taaatatcta	taccattact	aatattttta	420
gtttaaaggt	taataaatat	tttgttagaa	attccaatct	gcttgtaatt	tatcaataaaa	480
caaaatatta	aataacaagc	taaagtaaca	aataatatca	aactaataga	aacagtaatc	540
taatgtaaca	aaacataatc	taatgcta	ataacaaagc	gcaagatcta	tcattttata	600
tagtattatt	ttcaatcaac	attcttatta	atTTTctaaat	aatacttgta	gttttattaa	660
cttctaaatg	gattgactat	taattaaatg	aattagtcga	acatgaataa	acaaggtaac	720
atgatagatc	atgtcattgt	gttatcattg	atcttacatt	tggattgatt	acagttggga	780
aagctt						786

10

<210> 10

<211> 4746

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

cttttctctc	tctatctcta	tctctcgtag	cttgataaga	gtttctctct	tttgaagatc	60
cgtttctctc	tctctcactg	agactattgt	tgtaggtca	acttgcgatc	atggcgattt	120
cgaaggtctg	aagctgattt	cgaatggttt	ggagatatcc	gtagtggtta	agcatatgga	180
agtctatggt	ctgctcttgg	ttgctctggt	agggcttctt	ccatttggac	caacttagct	240
gaatgltgta	tgatctctct	ccttgaagca	gcaaataaga	agaaggtctg	gtccttaact	300
taacatctgg	ttactagagg	aaacttcagc	tattattagg	taaagaaaga	ctgtacagag	360
ttgtataaca	agtaagcgtt	agagtggctt	tgtttgctct	ggtgatagaa	gaaccgactg	420
attcgttggt	gtgtgtagc	tttggagggg	atcagatttc	gcgaggggag	gtgttttaga	480
tcaaatctgt	gaattttact	caactgaggc	ttttagttaa	ccacgactgt	agagttgacc	540
ttgaatccta	ctctgagtaa	ttatattatc	agatagattt	aggatggaag	ctgaaattgt	600
gaatgtgaga	cctcagctag	ggtttatcca	gagaatgggt	cctgctctac	ttcctgtcct	660
tttggtttct	gtcggatata	ttgatcccgg	gaaatgggtt	gcaaataatc	aaggaggtgc	720
tcgtttcggg	tatgacttgg	tggcaattac	tctgcttttc	aattttgccc	ccatcttatg	780
ccaatatggt	gcagctcgca	taagcgttgt	gactggtaaa	cacttggctc	agatctgcaa	840
tgaagaatat	gacaagtgga	cgtgcatggt	cttgggcatt	caggcggagt	tctcagcaat	900
tctgctcgac	cttaccatgg	ttgtgggagt	tgcgcatgca	cttaaccttt	tgtttgggggt	960
ggagttatcc	actggagtgt	ttttggccgc	catggatgcg	tttttatttc	ctgttttcgc	1020
ctctttcctt	gaaaatggta	tggcaaatac	agtatccatt	tactctgcag	gcctgggtatt	1080
acttctctat	gtatctggcg	tcttgetgag	tcagtctgag	atcccactct	ctatgaatgg	1140
agtgttaact	cggttaaatg	gagagagcgc	atcgcactg	atgggtcttc	ttggcgcaag	1200
catcgtcctt	cacaattttt	atatccattc	ttattttgct	ggggaaagta	catcttcgtc	1260
tgatgtcgac	aagagcagct	tgtgtcaaga	ccatttgttc	gccatctttg	gtgtcttcag	1320
cggactgtca	cttgtaaatt	atgtattgat	gaatgcagca	gctaattgtgt	ttcacagtac	1380
tggccttggt	gtactgactt	ttcacgatgc	cttgtcacta	atggagcagg	tatttatgag	1440
tccgctcatt	ccagtgggtct	ttttgatgct	cttgttcttc	tctagtcaaa	ttaccgact	1500

20

30

40

agcttgggct	ttcgggtggag	aggtcgtcct	gcatgacttc	ctgaagatag	aaatacccgc	1560
ttggcttcat	cgtgctacaa	tcagaattct	tgcagttgct	cctgcgcttt	attgtgtatg	1620
gacatctggg	gcagacggaa	tataccagtt	acttatattc	accaggtct	tggtggcaat	1680
gatgcttcc	tgctcggtaa	taccgctttt	ccgcattgct	tcgtcgagac	aatcatggg	1740
tgccataaa	atccctcagg	ttggcgagtt	cctcgcactt	acaacgtttt	tgggatttct	1800
ggggttgaat	gttgtttttg	ttgttgagat	ggtatttggg	agcagtgact	gggctgggtg	1860
tttgagatgg	aataccgtga	tgggcacctc	gattcagtac	accactctgc	ttgtatcgtc	1920
atgtgcatcc	ttatgcctga	tactctggct	ggcagccacg	ccgctgaaat	ctgcgagtaa	1980
cagagcggaa	gctcaaatat	ggaacatgga	tgctcaaaa	gctttatctt	atccatctgt	2040
tcaagaagag	gaaattgaaa	gaacagaaac	aaggaggaac	gaagacgaat	caatagtgcg	2100
gttggaaagc	agggtaaagg	atcagttgga	tactacgtct	gttactagct	cggctctatga	2160
tttgccagag	aacattctaa	tgacggatca	agaaatccgt	tcgagccctc	cagaggaaag	2220
agagttggat	gtaaagtact	ctacctctca	agttagtagt	cttaaggaag	actctgatgt	2280
aaaggaacag	tctgtattgc	agtcaacagt	ggttaatgag	gtcagtgata	aggatctgat	2340
tgttgaaaca	aagatggcga	aaattgaacc	aatgagtcct	gtggagaaga	ttgttagcat	2400
ggagaataac	agcaagttta	ttgaaaagga	tgttgaaggg	gtttcatggg	aaacagaaga	2460
agctaccaaa	gctgctecta	caagcaactt	tactgtcggg	tctgatggtc	ctccttcatt	2520
ccgcagctta	agtggggaag	ggggaagtgg	gactggaagc	ctttcacggt	tgcaaggttt	2580
gggacgtgct	gcccggagac	acttatctgc	gatccttgat	gaattttggg	gacatttata	2640
tgattttcat	gggcaattgg	ttgctgaagc	cagggcaaaag	aaactagatc	agctgtttgg	2700
cactgatcaa	aagtcagcct	cttctatgaa	agcagattcg	tttgaaaag	acattagcag	2760
tggatattgc	atgtcaccaa	ctgcgaaggg	aatggattca	cagatgactt	caagtttata	2820
tgattcactg	aagcagcaga	ggacaccggg	aagtatcgat	tcgttgtatg	gattacaaag	2880
aggttcgtca	ccgtcacctg	tggtcaaccg	tatgcagatg	ttgggtgcat	atggtaacac	2940
cactaataat	aataatgctt	acgaattgag	tgagagaaga	tactctagcc	tgcgtgctcc	3000
atcatcttca	gagggttggg	aacaccaaca	accagctaca	gttcacggat	accagatgaa	3060
gtcatatgta	gacaatttgg	caaaagaaag	gcttgaagcc	ttacaatccc	gtggagagat	3120
cccacatcg	agatctatgg	cgcttggtag	attgagctat	acacagcaac	ttgcttttagc	3180
cttgaacag	aagteccaga	atggtctaac	ccctggacca	gctcctgggt	ttgagaattt	3240
tgctgggtct	agaagcatat	cgcgacaatc	tgaaagatct	tattacgggtg	ttccatcttc	3300
tggcaatact	gatactgttg	gcgagcagct	agccaatgag	aaaaaatata	gtagcatgcc	3360
agatatctca	ggattgtcta	tgtccgcaag	gaacatgcat	ttaccaaca	acaagagtgg	3420
atactgggat	ccgtcaagtg	gaggaggagg	gtatggtgcg	tcttatggtc	ggttaagcaa	3480
tgaatcatcg	ttatattcta	atltggggtc	acgggtggga	gtaccctcga	cttatgatga	3540
catttctcaa	tcaagaggag	gctacagaga	tgcttacagt	ttgccacaga	gtgcaacaac	3600
agggaccgga	tcgctttggg	ccagacagcc	ctttgagcag	tttgggtgtag	cggagaggaa	3660
tgggtgctgtt	ggtgaggagc	tcaggaatag	atcgaatccg	atcaatatag	acaacaacgc	3720
ttcttcta	gttgatgcag	aggctaagct	tcttcagtcg	ttcaggcact	gtattctaaa	3780
gcttattaaa	cttgaaggat	ccgagtgggt	gtttggacaa	agcgatggag	ttgatgaaga	3840
actgattgac	cgggtagctg	cacgagagaa	gtttatctat	gaagctgaag	ctcgagaaat	3900
aaaccaggtg	ggtcacatgg	gggagccact	aatttcatcg	gttcctaact	gtggagatgg	3960
ttgcgttgg	agagctgatt	tgattgtgag	ctttggagtt	tggtgcattc	accgtgtcct	4020
tgacttgtct	ctcatggaga	gtcggcctga	gctttgggga	aagtacactt	acgttctcaa	4080

10

20

30

40

ccgcctacag ggagtgattg atccggcggt ctcaaagctg cggacaccaa tgacaccgtg 4140
 cttttgcctt cagattccag cgagccacca gagagcgagt ccgacttcag ctaacggaat 4200
 gttacctccg gctgcaaaac cggctaaagg caaatgcaca accgcagtca cacttcttga 4260
 tctaataaaa gacgttgaaa tggcaatctc ttgtagaaaa ggccgaaccg gtacagctgc 4320
 aggtgatgtg gctttcccaa aggggaaaga gaatttggct tcggttttga agcggtataa 4380
 acgtcggtta tcgaataaac cagtaggtat gaatcaggat ggaccgggtt caagaaaaaa 4440
 cgtgactgcg tacggatcat tgggttgaag aagaagaaca ttgtgagaaa tctcatgatc 4500
 aaagtgacgt cgagagggaa gccgaagaat caaaactctc gcttttgatt gctcctctgc 4560
 ttcgttaatt gtgtattaag aaaagaagaa aaaaaatgga tttttgttgc ttcagaattt 4620
 ttcgctcttt ttttcttaat ttggttgtaa tgttatgttt atatacatat atcatcatca 4680
 taggaccata gctacaaacc gaatccgggt tgtgtaattc tatgcggaat cataaagaaa 4740
 tcgtcg 4746

10

<210> 11

<211> 6022

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 11

20

aggtggcacg agcaccata accttcagac ctatagatac aaatatgtat gtatacgttt 60
 tttatatata aatattttat ataattgatt tttcgatctt cttttatctc tctctttcga 120
 tggaaactgag ctctttctct ctttctctt cttttctctc tctatctcta tctctcgtag 180
 cttgataaga gtttctctct tttgaagatc cgtttctctc tctctcactg agactattgt 240
 tgttaggtca acttgcgac atggcgattt cgaagggtgac ttctttcaaa aaccctaate 300
 ctctgttttt tttttatatt tgctgggggg ctttgtacgg actttcatgg gttttgtag 360
 cttttccctc ggcttttgcg caaatgagac tttctgggtt tttttccag cttttataa 420
 tttcatcagg tggatcgaat tcgtagtttc agcttagatc tctctcctc ttcattatct 480
 ggactttcca gacttggagt tcttcgggat tgttttcgggt tctcgggtt tgttttaatt 540
 gcgagattta agcttttttc tttttacta ctgtacttgg tttgtggttg accttttttt 600
 tccttgaaga tctgaatgcg tagatcatac gggatctttg catttttgtt gcttttcgtc 660
 agcgttacga ttcttttagc ttcagtttag ttgaaatttg ttttttttt gagcttatct 720
 tctttttgtt gctgcttcat actaagatca attattgatt tgtaatacta ctgtatctga 780
 agattttcac cataaaaaaa aaattcaggt ctgaagctga tttcgaatgg tttggagata 840
 tccgtagtgg ttaagcatat ggaagtctat gttctgctct tggttgctct gttagggctt 900
 cctccatttg gaccaactta gctgaatgtt gtatgatctc tctccttga gacgcaata 960
 agaagaaggt ctggtcctta acttaacatc tggttactag aggaaactc agctattatt 1020
 aggtaaagaa agactgtaca gagttgtata acaagtaagc gtttagagtg ctttgtttgc 1080
 ctcggtgata gaagaaccga ctgattcgtt gttgtgtgtt agctttggag ggaatcagat 1140
 ttcgcgaggg aagggtgttt agatcaaate tgtgaatttt actcaactga ggcttttagt 1200
 gaaccacgac tgtagagttg accttgaatc ctactctgag taattatatt atcagataga 1260
 tttaggatgg aagctgaaat tgtgaatgtg agacctcagc tagggtttat ccagagaatg 1320
 gttcctgctc tacttctgt ctttttgggt tctgtcggat atattgatcc cgggaaatgg 1380
 gttgcaaata tcgaaggagg tgctcgtttc gggtatgact tgggtggcaat tactctgctt 1440

30

40

ttcaattttg	ccgccatctt	atgccaatat	gttgcagctc	gcataagcgt	tgtgactggt	1500
aaacacttgg	ctcaggtaaa	catttttctg	atctctaaag	aacaaacttt	ttaaaataac	1560
aaactgggct	ctgtggttgt	cttgtcactt	tctcaaagtg	gaattctact	aaccaccttc	1620
tctatttttc	taacatttta	atgttcttta	ctgggacaga	tctgcaatga	agaatatgac	1680
aagtggacgt	gcatgttctt	gggcattcag	gcgagattct	cagcaattct	gctcgacctt	1740
accatggtag	ttacttacia	tctttgctgt	tcttaatttt	tttattatgt	gataaaaattt	1800
tgattcctct	gacttgagct	tctctattat	aaacaggttg	tgggagttgc	gcatgcactt	1860
aaccttttgt	ttggggtgga	gttatccact	ggagtgtttt	tggccgccat	ggatgcgttt	1920
ttatttctctg	ttttcgctc	tttcttgta	tgactggctt	tctgtcttg	tttttttct	1980
ccacgttctt	gaaatagcat	tattggaaat	tagctgacat	gcatacaatt	tctgacagga	2040
aaatggtagt	gcaaatacag	tatccattta	ctctgcaggc	ctggtattac	ttctctatgt	2100
atctggcgct	ttgctgagtc	agtctgagat	cccactctct	atgaatggag	tgttaactcg	2160
gttaaattgga	gagagcgcac	tgcactgat	gggtcttctt	ggcgcaagca	tcgtccctca	2220
caatttttat	atccattctt	attttgctgg	ggtacctttt	ttctctttat	atgtatctct	2280
cttttctggt	aagaagcaat	aattatacta	agcagtgaac	gctctattac	aggaaagtac	2340
atcttctgct	gatgtcgaca	agagcagctt	gtgtcaagac	catttgttcg	ccatctttgg	2400
tgtcttcagc	ggactgtcac	ttgtaaatta	tgtattgatg	aatgcagcag	ctaatgtggt	2460
tcacagtact	ggccttgtgg	tactgacttt	tcacgatgcc	ttgtcactaa	tggagcaggt	2520
ttgttctgac	ggttttatgt	tcgtattagt	ctataattca	tttttaggga	aaatgttcag	2580
aaatctctcg	tgattattaa	ttatcttggt	cttgattggt	gatcacaggt	atztatgagt	2640
ccgctcattc	cagtgttctt	ttgatgctc	ttgttcttct	ctagtcaaat	taccgcaacta	2700
gcttgggctt	tcggtggaga	ggtcgtcctg	catgacttcc	tgaagataga	aataccogct	2760
tggcttcatc	gtgctacaat	cagaattctt	gcagttgctc	ctgcgcttta	ttgtgtatgg	2820
acatctgggtg	cagacggaat	ataccagtta	cttatattca	cccaggtctt	ggtggcaatg	2880
atgcttctct	gctcggtaat	accgcttttc	cgcattgctt	cgctcgagaca	aatcatgggt	2940
gtccataaaa	tcctcaggt	tggcgagttc	ctcgcactta	caacgttttt	gggatttctg	3000
gggttgaatg	ttgtttttgt	tgttgagatg	gtatttggga	gcagtgactg	ggctgggtggt	3060
ttgagatgga	ataccgtgat	gggcacctcg	attcagtaca	ccactctgct	tgtatcgctca	3120
tgtgcatcct	tatgcctgat	actctggctg	gcagccacgc	cgctgaaatc	tgcgagtaac	3180
agagcgggaag	ctcaaataatg	gaacatggat	gctcaaaatg	ctttatctta	tccatctggt	3240
caagaagagg	aaattgaaag	aacagaaaca	aggaggaacg	aagacgaatc	aatagtgcgg	3300
ttggaaagca	gggtaaagga	tcagttggat	actacgtctg	ttactagctc	ggtctatgat	3360
ttgccagaga	acattctaata	gacggatcaa	gaaatccgtt	cgagccctcc	agaggaaaga	3420
gagttggatg	taaagtactc	tacctctcaa	gttagtagtc	ttaaggaaga	ctctgatgta	3480
aaggaacagt	ctgtattgca	gtcaacagtg	gttaatgagg	tcagtgataa	ggatctgatt	3540
gttgaacaaa	agatggcgaa	aattgaacca	atgagtcctg	tggagaagat	tgtagcatg	3600
gagaataaca	gcaagtttat	tgaaaaggat	gttgaagggg	tttcatggga	aacagaagaa	3660
gctaccaaaag	ctgctcctac	aagcaacttt	actgtcggat	ctgatggtcc	tccttcattc	3720
cgcagcttaa	gtggggaagg	gggaagtggg	actggaagcc	tttcacgggt	gcaaggtttg	3780
ggacgtgctg	cccggagaca	cttatctgcg	atccttgatg	aattttgggg	acatttataat	3840
gattttcatg	ggcaattggt	tgctgaagcc	agggcaaaga	aactagatca	gctgtttggc	3900
actgatcaaa	agtcagcctc	ttctatgaaa	gcagattcgt	ttggaaaaga	cattagcagt	3960
ggatattgca	tgtcaccaac	tgcgaaggga	atggattcac	agatgacttc	aagtttataat	4020

10

20

30

40

gattcactga agcagcagag gacaccggga agtatcgatt cgttgatgg attacaaaga 4080
 ggttcgtcac cgtcaccggtt ggtcaaccgt atgcagatgt tgggtgcata tggtaacacc 4140
 actaataata ataatgctta cgaattgagt gagagaagat actctagcct gcgtgctcca 4200
 tcatcttcag agggttggga acaccaacaa ccagctacag ttcacggata ccagatgaag 4260
 tcatatgtag acaatttggc aaaagaaagg cttgaagcct tacaatcccg tggagagatc 4320
 ccgacatcga gatctatggc gcttggtaca ttgagctata cacagcaact tgctttagcc 4380
 ttgaaacaga agtcccagaa tgggtctaacc cctggaccag ctctggggtt tgagaatddd 4440
 gctgggtcta gaagcatatc gcgacaatct gaaagatctt attacggtgt tccatcttct 4500
 ggcaatactg atactgttgg cgcagcagta gccaatgaga aaaaatatag tagcatgcca 4560
 gatatctcag gattgtctat gtccgcaagg aacatgcatt taccaacaa caagagtggga 4620
 tactgggatc cgtcaagtgg aggaggaggg tatgggtgct cttatgggtcg gttaagcaat 4680
 gaatcatcgt tatattctaa tttgggggtca cgggtgggag taccctcgac ttatgatgac 4740
 atttctcaat caagaggagg ctacagagat gcctacagtt tgccacagag tgcaacaaca 4800
 gggaccggat cgctttggtc cagacagccc tttgagcagt ttggtgtagc ggagaggaat 4860
 ggtgctgttg gtgaggagct caggaataga tcgaatccga tcaatataga caacaacgct 4920
 tcttctaata ttgatgcaga ggctaagctt cttcagtcgt tcaggcactg tattctaaag 4980
 cttattaaac ttgaaggatc cgagtgggtt tttggacaaa gcgatggagt tgatgaagaa 5040
 ctgattgacc gggtagctgc acgagagaag tttatctatg aagctgaagc tcgagaaata 5100
 aaccagggtg gtcacatggg ggagccacta atttcatcgg ttcctaactg tggagatggg 5160
 tgcgtttgga gagctgattt gattgtgagc tttggagttt ggtgcattca ccgtgtcctt 5220
 gacttgtctc tcatggagag tcggcctgag ctttggggaa agtacactta cgttctcaac 5280
 cgcctacagg taacaaaaac cgcagtagtt cattgaaaat cacagttttg cagtttgaaa 5340
 atattgacat gtatggattt aaacaggggag tgattgatcc ggcgttctca aagctgcgga 5400
 caccaatgac accgtgcttt tgccttcaga ttcagcggag ccaccagaga gcgagtccga 5460
 cttcagctaa cggaatgtta cctccggctg caaaaccggc taaaggcaaa tgcacaaccg 5520
 cagtcacact tcttgatcta atcaaagacg ttgaaatggc aatctcttgt agaaaaggcc 5580
 gaaccggtac agctgcaggt gatgtggctt tcccaaaggg gaaagagaat ttggcttcgg 5640
 ttttgaagcg gtataaacgt cggttatcga ataaaccagt aggtatgaat caggatggac 5700
 ccggttcaag aaaaaacgtg actgcgtacg gatcattggg ttgagaaga agaacattgt 5760
 gagaaatctc atgatcaaag tgacgtcgag agggaagccg aagaatcaaa actctcgctt 5820
 ttgattgctc ctctgcttcg ttaattgtgt attaagaaaa gaagaaaaaa aatggatddd 5880
 tgttgcttca gaatdddctg ctcttdtdtd cttaattdtg ttgtaatgtd atgttdtat 5940
 acatatatca tcatcatagg accatagcta caaacccaat ccggttdtg taattdtatg 6000
 cggaatcata aagaaatcgt cg 6022

10

20

30

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR amplification of part of EIN2

<400> 12
gctggatccg gtaccttgaa tcctactctg ag 32

<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer for PCR amplification of part of EIN2 10

<400> 13
gagatcgatc tcagactgac tcagca 26

<210> 14
<211> 368
<212> DNA
<213> Artificial 20

<220>
<223> PSTVd variant

<400> 14
agatctcggg actaaactcg tggttcctgt ggttcacacc tgacctcctg acaagaaaag 60
aaaaaagaag gcggtcggg ggagcgcttc agggatcccc ggggaaacct ggagcgaact 120
ggcaaaaaag gacgggtgggg agtgcccagc ggccgacagg agtaattccc gccaaacagg 180
gttttcacct ttcttttctt cgggtgtcct tctcgcgcc cgcaggacca cccctggacc 240
cctttgcgct gtcgcttcgg ctactaccg gtggaaacaa ctgaagctcc cgagaaccgc 300
tttttctcta tcttacttgc tcgggcgagg gtgttttagcc cttggaaccg cagttggttc 360
ctagatct 368 30

<210> 15
<211> 358
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PSTVd variant 40

<400> 15
agatctcggg actaaactcg tggttcctgt ggttcacacc tgacctcctg acaagaaaag 60
aaaaaagaag gcggtcggg ggagcgcttc agggatcccc ggggaaacct ggagcgaact 120
ggcaaaaaagg acgggtgggga gtgcccagcg gccgacagga gtaattcccc ccgaaacagg 180

```

gttttcaccc tttctttctt cgggtgtcct tcctcgcgcc cggaggacca cccctcgccc 240
cctttgcgct gtcgcttcgg ctactaccgg gtggaacaa ctgaagctcc cgagaaccgc 300
tttttctcta tcttacgagg gtgttagcc ctggaaccg cagttggttc ctagatct 358

```

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

5 <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization 10
  <120> Modified gene-silencing RNA and uses thereof
  <130> BROLGA-W01
10 <150> 60/363851
  <151> 2002-03-14
  <160> 15
15 <170> PatentIn version 3.0 20
  <210> 1
  <211> 29
  <212> DNA
20 <213> Artificial
  <220>
  <223> oligonucleotide primer for the PCR amplification of the genome of
  PSTVd RG1
25 <400> 1
  cgcagatctc ggaactaac tcgtggttc 29
  <210> 2
30 <211> 27
  <212> DNA
  <213> Artificial
  <220>
35 <223> oligonucleotide primer for the PCR amplification of the genome of
  PSTVd RG1
  <400> 2
  gcgagatcta ggaaccaact gcggttc 27
40 <210> 3
  <211> 359
  <212> DNA

```

<213> Potato spindle tuber viroid

<400> 3

	cggaactaaa	ctcgtgggtc	ctgtggttca	cacctgacct	cctgacaaga	aaagaaaaaa	60	
5	gaaggcggct	cggaggagcg	cttcagggat	ccccgggaa	acctggagcg	aactggcaaa	120	
	aaaggacggg	ggggagtgcc	cagcggccga	caggagtaat	tccccccgaa	acagggtttt	180	
	cacccttcc	ttcttcgggt	gtccttcctc	gcgcccgcag	gaccaccctc	cgcccccttt	240	
	gcgctgtgc	ttcggtact	accgggtgga	aacaactgaa	gctcccgaga	accgtttttt	300	
10	ctctatctta	cttgetccgg	ggcgaggggtg	tttagccctt	ggaaccgcag	ttggttctc	359	

<210> 4

<211> 369

<212> DNA

<213> Australian grapevine viroid

15

<400> 4

	tgggcaccaa	ctagaggttc	ctgtggtact	caccgaaggc	cgcgaaacgta	gaaagaaaa	60	
	agatagaaaa	gctgggtaag	actcacctgg	cgactcgtcg	tcgacgaagg	gtcctcagca	120	
	gagcaccggc	aggaggcgct	atgcaggaac	gctaggggtc	ctccagcggg	ggactgaaga	180	
20	aactccggtt	tcttctttca	ctctgtagct	ggaatccctg	ttgcgcttgc	tggcgaaacc	240	
	tgcaggaag	ctagctgggt	cccgctagtc	gagcggactc	gtcccagcgg	tccaaccag	300	
	ttttctttat	cctatctttc	ctgcccggcgc	ccggtcgtgg	ttaccctgga	gctcctgtt	360	
	tggaggccc						369	20

<210> 5

<211> 254

<212> DNA

<213> Coconut tinangaja viroid

30

<400> 5

	ctggggaatt	cccacggctc	ggcaaaataa	aagcacaaga	gcgactgcta	gagggatccc	60	
	cggggaaacc	cctagcaacc	gaggtagggg	gcgtacctgg	tgctgcogat	tcgtgctggt	120	
	tgggcttcgt	cccttcogag	cttcgatccg	acgcccggcc	gcttctctgc	cgaagctgct	180	
	acggagacta	cccgggtggat	acaactcttt	gcagcgcctc	gtgtaataaa	agctcgagtc	240	
35	cggtttgcgc	ccct					254	30

<210> 6

<211> 360

<212> DNA

40

<213> Tomato planta macho viroid

<400> 6

	cgggatcttt	tccttgtggt	tcctgtggta	cacacctgac	ctcctgacca	gaaaagaaaa	60	
--	------------	------------	------------	------------	------------	------------	----	--

aagaattgcg gccaaaggag cgcttcaggg atccccgggg aaacctggag cgaactggcg 120
 aaggagtgcg ggctggggag tctcccagac aggagtaatc cccgctgaaa cagggttttc 180
 acccttcctt tcttcggggt tcttctctct ggggtcgaca cctcgcgccc cttctcttgc 240
 gctgtcgctt cggagactac ccggtggaaa caactgaagc tcccaagcgc cgctttttct 300
 5 ctatcttgct ggctccgggg cgaggggtgga aaacctgga acccttcgaa aagggtcctt 360

<210> 7

<211> 256

<212> DNA

10 <213> Hop latent viroid

<400> 7

ctggggaata cactacgtga cttacctgta tgatggcaag ggttcgaaga gggatccccg 60
 gggaaacctt ctcgagcgag gcggagatcg agcgcagtt cgtgcgcggc gacctgaagt 120
 15 tgcttcggct tcttcttgtt cgcgtcctgc gtggaacggc tccttctcca caccagccgg 180
 agttggaaac taccgggtgg atacaactct tgagcgccga gctttacctg cagaagtcca 240
 cataaaaagt gcccat 256

<210> 8

20 <211> 360

<212> DNA

<213> Tomato apical stunt viroid

<400> 8

25 cgggatcttt cgtgaggttc ctgtgggtct cacctgacct tgcaggcacc aagaaaaaag 60
 ataggagcgg gaaggaagaa gtcccttcagg gatccccggg gaaacctgga ggaagtcgag 120
 gtccggggct toggatcatt cctgggtgag acaggagtaa tcccagctga aacagggttt 180
 tcaccttcc tttcttctgg tttccttct ctcgcccggaa ggtcttcggc cctcgcgccc 240
 agcttctctc tggagactac ccggtggaaa caactgaagc ttcacttcc acgtcttttt 300
 30 tctctatctt tgttgctctc cgggcgaggg tgaaagcccg tggaaccctg aatggtcctt 360

<210> 9

<211> 786

<212> DNA

35 <213> Artificial

<220>

<223> nucleotide sequence of the pdk2 intron

40 <400> 9

aagcttggtg aggaaataat tttttctttt tttcctttta gtataaata gttaagtgat 60
 gttaattagt atgattataa taatatagtt gttataattg tgaaaaata atttataaat 120
 atattgttta cataaacaac atagtaatgt aaaaaaatal gacaagtgat gtgtaagacg 180

10

20

30

40

	aagaagataa	aagttgagag	taagtatatt	atTTTTaatg	aatttgatcg	aacatgtaag	240	
	atgatatact	agcattaata	tttgttttaa	tcataatagt	aattctagct	ggtttgatga	300	
	attaaatatac	aatgataaaa	tactatagta	aaaataagaa	taaataaatt	aaaataatat	360	
	ttttttatga	ttaatagttt	attatataat	taaatatcta	taccattact	aaatatttta	420	
5	gtttaaaagt	taataaatat	tttgttagaa	attccaatct	gcttgtaatt	tatcaataaa	480	
	caaaatatta	aataacaagc	taaagtaaca	aataatatca	aactaataga	aacagtaatc	540	
	taatgtaaca	aaacataatc	taatgcta	ataacaaagc	gcaagatcta	tcattttata	600	
	tagtattatt	ttcaatcaac	attcttatta	atTTCTaaat	aatacttgta	gtttttataa	660	
	cttctaaatg	gattgactat	taattaaatg	aattagtcga	acatgaataa	acaaggtaac	720	
10	atgatagatc	atgtcattgt	gttatcattg	atcttacatt	tggattgatt	acagttggga	780	
	aagctt						786	10
	<210>	10						
	<211>	4746						
15	<212>	DNA						
	<213>	Arabidopsis thaliana						
	<400>	10						
	cttttctctc	tctatctcta	tctctcgtag	cttgataaga	gtttctctct	tttgaagatc	60	
20	cgtttctctc	tctctcactg	agactattgt	tgtaggtca	acttgcgac	atggcgattt	120	
	cgaaggtctg	aagctgattt	cgaatggttt	ggagatatcc	gtagtggta	agcatatgga	180	
	agtctatggt	ctgctcttgg	ttgctctgtt	agggcttctc	ccatttgac	caacttagct	240	
	gaatgttgta	tgatctctct	ccttgaagca	gcaataaga	agaaggctcg	gtccttaact	300	20
	taacatctgg	ttactagagg	aaacttcagc	tattattagg	taaagaaaga	ctgtacagag	360	
25	ttgtataaca	agtaagcgtt	agagtggctt	tgtttgccct	ggatgataga	gaaccgactg	420	
	attcgttggt	gtgtgttagc	tttggaggga	atcagatttc	gcgagggaag	gtgtttttaga	480	
	tcaaatctgt	gaattttact	caactgaggc	ttttagttaa	ccacgactgt	agagttgacc	540	
	ttgaatccta	ctctgagtaa	ttatattatc	agatagattt	aggatggaag	ctgaaattgt	600	
	gaatgtgaga	cctcagctag	ggtttatcca	gagaatgggt	cctgctctac	ttctgtctct	660	
30	tttggtttct	gtcggatata	ttgatcccgg	gaaatgggtt	gcaaatatcg	aaggaggtgc	720	
	tcgtttgggg	tatgacttgg	tggcaattac	tctgcttttc	aattttgccc	ccatcttatg	780	
	ccaatatggt	gcagctcgca	taagcgttgt	gactggtaaa	cacttggctc	agatctgcaa	840	
	tgaagaatat	gacaagtgga	cgtgcatggt	cttgggcatt	caggcggagt	tctcagcaat	900	
	tctgctcgac	cttaccatgg	ttgtgggagt	tgcgcatgca	cttaaccttt	tgtttggggg	960	30
35	ggagtatacc	actggagtgt	ttttggccgc	catggatgcg	tttttatttc	ctgttttcgc	1020	
	ctctttcctt	gaaaatggta	tggcaaatac	agtatccatt	tactctgcag	gcctgggtatt	1080	
	acttctctat	gtatctggcg	tcttgetgag	tcagtctgag	atcccactct	ctatgaatgg	1140	
	agtgttaact	cggttaaatg	gagagagcgc	attcgcactg	atgggtcttc	ttggcgcgaag	1200	
	catcgtccct	cacaattttt	atatccattc	ttattttgct	ggggaaagta	catcttcgtc	1260	
40	tgatgtcgac	aagagcagct	tgtgtcaaga	ccatttggtc	gccatctttg	gtgtcttcag	1320	
	cggactgtca	cttgtaaatt	atgtattgat	gaatgcagca	gctaagtgtg	ttcacagtac	1380	
	tggccttggtg	gtactgactt	ttcacgatgc	cttgtcacta	atggagcagg	tatttatgag	1440	
	tccgctcatt	ccagtggtct	ttttgatgct	cttgttcttc	tctagtcaaa	ttaccgcaat	1500	

	agcttgggct	ttcgggtggag	aggctcgtcct	gcatgacttc	ctgaagatag	aaataccgc	1560	
	ttggcttcat	cgtgctacaa	tcagaattct	tgcagttgct	cctgcgcttt	attgtgtatg	1620	
	gacatctggg	gcagacggaa	tataccagtt	acttatattc	accaggtct	tgggtggcaat	1680	
	gatgcttcc	tgctcggtaa	taccgctttt	cgcattgct	tcgtcgagac	aaatcatggg	1740	
5	tgtccataaa	atccctcagg	ttggcgagtt	cctcgcactt	acaacgtttt	tgggatttct	1800	
	ggggttgaat	gttgtttttg	ttgttgagat	ggatatttggg	agcagtgact	gggctgggtg	1860	
	tttgagatgg	aataccgtga	tgggcacctc	gattcagtac	accactctgc	ttgtatctgc	1920	
	atgtgcatcc	ttatgcctga	tactctggct	ggcagccacg	ccgctgaaat	ctgcgagtaa	1980	
	cagagcggaa	gctcaaatat	ggaacatgga	tgctcaaaat	gctttatctt	atccatctgt	2040	
10	tcaagaagag	gaaattgaaa	gaacagaaac	aaggaggaac	gaagacgaat	caatagtgcg	2100	
	gttgaaagc	agggtaaagg	atcagttgga	tactacgtct	gttactagct	cggctctatga	2160	10
	tttgccagag	aacattctaa	tgacggatca	agaaatccgt	tcgagccctc	cagaggaag	2220	
	agagtggat	gtaaagtact	ctacctctca	agttagtagt	cttaaggaag	actctgatgt	2280	
	aaaggaacag	tctgtattgc	agtcaacagt	ggtaaatgag	gtcagtgata	aggatctgat	2340	
15	tgttgaaaca	aagatggcga	aaattgaacc	aatgagtcct	gtggagaaga	ttgttagcat	2400	
	ggagaataac	agcaagttta	ttgaaaagga	tgttgaaggg	gtttcatggg	aaacagaaga	2460	
	agctacccaa	gctgctccta	caagcaactt	tactgtcgga	tctgatggtc	ctccttcatt	2520	
	ccgcagctta	agtggggaag	ggggaagtgg	gactggaagc	ctttcacggg	tgcaaggttt	2580	
	gggacgtgct	gcccggagac	acttatctgc	gaccttgat	gaattttggg	gacatttata	2640	
20	tgattttcat	gggcaattgg	ttgctgaagc	cagggcaaag	aaactagatc	agctgtttgg	2700	
	cactgatcaa	aagtcagcct	cttctatgaa	agcagattcg	tttgaaaag	acattagcag	2760	
	tggatattgc	atgtcaccaa	ctgcgaagg	aatggattca	cagatgactt	caagtttata	2820	
	tgattcactg	aagcagcaga	ggacaccggg	aagtatcgat	tcgtttgatg	gattacaag	2880	20
	aggttctgca	ccgtcacctg	tggtaaccg	tatgcagatg	ttgggtgcat	atggtaacac	2940	
25	cactaataat	aataatgctt	acgaattgag	tgagagaaga	tactctagcc	tgctgctccc	3000	
	atcatcttca	gagggttggg	aacaccaaca	accagctaca	gttcacggat	accagatgaa	3060	
	gtcatatgta	gacaatttgg	caaaagaaag	gcttgaagcc	ttacaatccc	gtggagagat	3120	
	cccagactcg	agatctatgg	cgcttggtag	attgagctat	acacagcaac	ttgcttttagc	3180	
	cttgaacag	aagtcccaga	atggtctaac	ccctggacca	gctcctgggt	ttgagaattt	3240	
30	tgctgggtct	agaagcabat	cgcgacaatc	tgaagatct	tattacgggtg	ttccatcttc	3300	
	tggcaataact	gatactgttg	gcgcagcagt	agccaatgag	aaaaaatata	gtagcatgcc	3360	
	agatatctca	ggattgtcta	tgtccgcaag	gaacatgcat	ttaccaaca	acaagagtgg	3420	
	atactgggat	ccgtcaagtg	gaggaggagg	gtatgggtgcg	tottatggtc	ggtaagcaa	3480	
	tgaatcatcg	ttatattcta	atltggggtc	acgggtggga	gtaccctcga	cttatgatga	3540	
35	catttctcaa	tcaagaggag	gctacagaga	tgctacagt	ttgccacaga	gtgcaacaac	3600	30
	agggaccgga	tcgctttggg	ccagacagcc	ctttgagcag	tttgggtgtag	cggagaggaa	3660	
	tgggtctggt	ggtgaggagc	tcaggaatag	atcgaatccg	atcaatatag	acaacaacgc	3720	
	ttcttcta	gttgatgcag	aggctaagct	tcttcagtcg	ttcaggcact	gtattctaaa	3780	
	gcttattaaa	cttgaaggat	ccgagtgggt	gtttggacaa	agcgatggag	ttgatgaaga	3840	
40	actgattgac	cggttagctg	cacgagagaa	gtttatctat	gaagctgaag	ctcgagaaat	3900	
	aaaccaggtg	ggtcacatgg	gggagccact	aatttcatcg	gttcctaact	gtggagatgg	3960	
	ttgcgtttgg	agagctgatt	tgattgtgag	ctttggagtt	tgggtgcatc	accgtgtcct	4020	
	tgactgtctc	ctcatggaga	gtcggcctga	gctttgggga	aagtacactt	acgttctcaa	4080	

ccgcctacag ggagtgattg atccggcggt ctcaaagctg cggacaccaa tgacaccgtg 4140
 cttttgcctt cagattccag cgagccacca gagagcgagt ccgacttcag ctaacggaat 4200
 gttaccctccg gctgcaaaac cggctaaagg caaatgcaca accgcagtca cactttctga 4260
 tctaatacaaa gacggtgaaa tggcaatctc ttgtagaaaa ggccgaaccg gtacagctgc 4320
 5 aggtgatgtg gctttcccaa aggggaaaga gaatttggct tcggttttga agcgggtataa 4380
 acgtcgggta tcgaataaac cagtaggtat gaatcaggat ggaccgggtt caagaaaaaa 4440
 cgtgactgcg tacggatcat tgggttgaag aagaagaaca ttgtgagaaa tctcatgatc 4500
 aaagtgacgt cgagagggaa gccgaagaat caaaactctc gcttttgatt gctcctctgc 4560
 ttctgtaatt gtgtattaag aaaagaagaa aaaaaatgga tttttgttgc ttcagaattt 4620
 10 ttctctcttt ttttcttaat ttggttgtaa tgttatgttt atatacatat atcatcatca 4680
 taggaccata gctacaaacc gaatccgggt tgtgtaattc tatgcggaat cataaagaaa 4740
 tcgtcg 4746

10

<210> 11
 15 <211> 6022
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 11
 20 aggtggcagc agcaccata accttcagac ctatagatac aaatatgtat gtatcgttt 60
 tttatatata aatattttat ataattgatt ttctgatctt cttttatctc tctctttcga 120
 tggaaactgag ctctttctct ctttctctt cttttctctc tctatctcta tctctcgtag 180
 cttgataaga gtttctctct tttgaagatc cgtttctctc tctctcactg agactattgt 240
 tgttaggtca acttgcgato atggcgattt cgaagggtgac ttctttcaaa aaccttaate 300
 25 ctctgttttt ttttttattt tgcctggggg ctttgtacgg actttcatgg gttttttag 360
 cttttccctc ggcttttgcg caaatgagac tttctgggtt tttttccag ctttttataa 420
 tttcatcagg tggatcgaat tcgtagtctc agcttagatc tctctccctc ttcattatct 480
 ggactttcca gacttggagt tcttcgggat tgttttcggg ttctgggttt tgttttaatt 540
 gcgagattta agcttttttc ttttttacta ctgtacttgg tttgtggttg accttttttt 600
 30 tcttgaaga tetgaatgag tagatcatac gggatctttg cttttttgtt gcttttctgc 660
 agcgttacga ttcttttagc ttcagtttag ttgaaatttg tttttttttt gagcttatct 720
 tctttttgtt gctgcttcat actaagatca attattgatt tgaataacta ctgtatctga 780
 agattttcac cataaaaaaa aaatcagggt ctgaagctga tttcgaatgg tttggagata 840
 tccgtagtgg ttaagcatat ggaagtctat gttctgctct tgggtgctct gttagggtct 900
 35 cctccatttg gaccaactta getgaatggt gtatgatctc tctccttgaa gcagcaata 960
 agaagaaggt ctggctctta acttaacatc tggttactag aggaaacttc agctattatt 1020
 aggtaaagaa agactgtaca gagttgtata acaagtaagc gtttagagtgg ctttgtttgc 1080
 ctccggtgata gaagaaccga ctgattcgtt gttgtgtgtt agctttggag ggaatcagat 1140
 ttcgcgaggg aagggtgttt agatcaaatc tgtgaatttt actcaactga ggcttttagt 1200
 40 gaaccacgac tgtagagttg accttgaatc ctactctgag taattatatt atcagataga 1260
 tttaggatgg aagctgaaat tgtgaatgtg agacctcagc tagggtttat ccagagaatg 1320
 gttcctgctc tacttctgtt ctttttgggt tctgtcggat atattgatcc cgggaaatgg 1380
 gttgcaata tcgaaggagg tgctcgtttc gggatgact tgggtgcaat tactctgctt 1440

20

30

40

	gattcactga agcagcagag gacaccggga agtatcgatt cgttgatggtg attacaaaga	4080	
	ggttcgtcac cgtcaccggtt ggtcaaccgt atgcagatgt tgggtgcata tggtaacacc	4140	
	actaataata ataatgctta cgaattgagt gagagaagat actctagcct gcgtgctcca	4200	
	tcatcttcag aggggttggga acaccaacaa ccagctacag ttccacggata ccagatgaag	4260	
5	tcatatgtag acaatttggc aaaagaaagg cttgaagcct tacaatcccg tggagagatc	4320	
	ccgacatcga gatctatggc gcttgggtaca ttgagctata cacagcaact tgctttagcc	4380	
	ttgaaacaga agtcccagaa tggctctaacc cctggaccag ctectgggtt tgagaathtt	4440	
	gctgggtota gaagcatatc gcgacaatct gaaagatott attacgggtt tccatcttct	4500	
	ggcaatactg atactgttgg cgcagcagta gccaatgaga aaaaatatag tagcatgcca	4560	
10	gatattctcag gattgtctat gtcgcaagg aacatgcatt taccaaacaa caagagtgga	4620	
	tactgggatc cgtcaagtgg aggaggaggg tatggtgctg cttatggtcg gttaagcaat	4680	
	gaatcatcgt tataattctaa tttgggttca cgggtgggag taccctcgac ttatgatgac	4740	10
	atcttcaat caagaggagg ctacagagat gcctacagtt tgccacagag tgcaacaaca	4800	
	gggaccggat cgctttggtc cagacagccc tttgagcagt ttggtgtagc ggagaggaat	4860	
15	ggtgctgttg gtgaggagct caggaataga tcgaatccga tcaatataga caacaacgct	4920	
	tcttctaatag ttgatgcaga ggctaagctt cttcagtcgt tcaggcactg tattctaaag	4980	
	cttattaaac ttgaaggatc cgagtggttg tttggacaaa gcgatggagt tgatgaagaa	5040	
	ctgattgacc gggtagctgc acgagagaag tttatctatg aagctgaagc tcgagaaata	5100	
	aaccaggtgg gtcacatggg ggagccacta atttcatcgg ttcttaactg tggagatggt	5160	
20	tgcglttggga gagctgattt gattgtgagc tttggagttt ggtgcattca cctgtcctt	5220	
	gacttgtctc tcatggagag tcggcctgag ctttggggaa agtacactta cgttctcaac	5280	
	cgcttacagg taacaaaaac cgcagtagtt cattgaaaat cacagttttg cagtttgaaa	5340	
	atattgacat gtatggattt aaacaggag tgattgatcc ggcgttctca aagctgcgga	5400	20
	caccaatgac accgtgcttt tgcttcaga ttccagcgag ccaccagaga gcgagtccga	5460	
25	cttcagctaa cggaatgtta cctccggetg caaaaccggc taaaggcaaa tgcaaacccg	5520	
	cagtcacact tcttgatcta atcaaagacy ttgaaatggc aatctcttgt agaaaaggcc	5580	
	gaaccggtac agctgcaggt gatgtggctt tcccaaaggg gaaagagaat ttggcttcgg	5640	
	ttttgaagcg gtataaacgt cggttatcga ataaaccagt aggtatgaat caggatggac	5700	
	ccggttcaag aaaaaacgtg actgcgtacg gatcattggg ttgaagaaga agaacattgt	5760	
30	gagaaatctc atgatcaaag tgacgtcgag agggaaagccg aagaatcaaa actctcgctt	5820	
	ttgattgctc ctctgcttcg ttaattgtgt attaagaaaa gaagaaaaaa aatggathtt	5880	
	tgttgcttca gaatttttcg ctcttttttt cttaatttgg ttgtaatggt atgtttatat	5940	
	acatatatca tcatcatagg accatagcta caaacccaat ccggtttgtg taattctatg	6000	
	cggaatcata aagaaatcgt cg	6022	
35			30
	<210> 12		
	<211> 32		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> oligonucleotide primer for PCR amplification of part of EIN2		

<400> 12
 gctggatccg gtaccttgaa tcctactctg ag 32

<210> 13
 5 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> oligonucleotide primer for PCR amplification of part of EIN2

<400> 13
 gagatcgatc tcagactgac tcagca 26

15 <210> 14
 <211> 368
 <212> DNA
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> PSTVd variant

<400> 14
 25 agatctcgga actaaactcg tggttcctgt ggttcacacc tgacctcctg acaagaaaag 60
 aaaaaagaag gcggctcgga ggagcgcttc agggatcccc ggggaaacct ggagcgaact 120
 ggcaaaaaag gacggtgggg agtcccagc gcccgacagg agtaattccc gccaaacagg 180
 gttttcacct ttcttttctt cgggtgtcct tctcgcgcc cggaggacca ccctcggacc 240
 cctttgcgct gtcgcttcgg ctactaccg gtggaaacaa ctgaagctcc cgagaaccgc 300
 tttttcteta tcttacttgc tcggcgagg gtgtttagcc cttggaaccg cagttggttc 360
 30 ctagatct 368

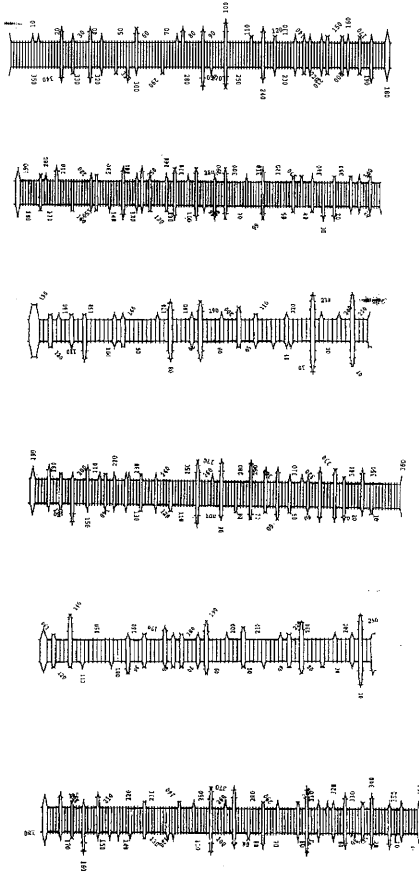
<210> 15
 <211> 358
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> PSTVd variant

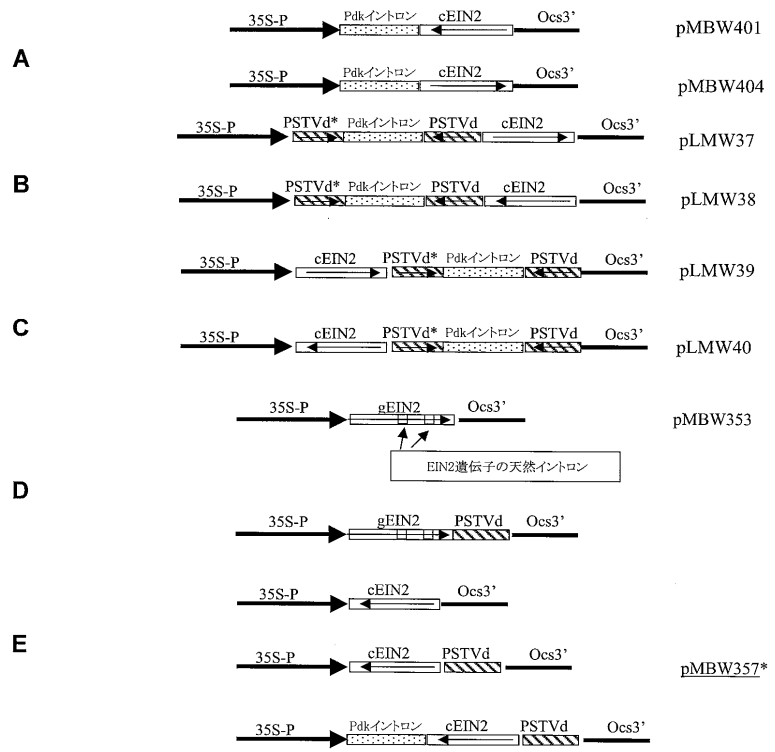
40 <400> 15
 agatctcgga actaaactcg tggttcctgt ggttcacacc tgacctcctg acaagaaaag 60
 aaaaaagaag gcggctcgga ggagcgcttc agggatcccc ggggaaacct ggagcgaact 120
 ggcaaaaagg acggtgggga gtgcccagc gcccgacagga gtaattcccc ccgaaacagg 180

gttttcaccc tttctttctt cgggtgtcct tctcgcgcc cggaggacca ccctcggcc 240
 cctttgcgct gtcgcttcgg ctactaccg gtggaaacaa ctgaagctcc cgagaaccgc 300
 tttttcteta tcttaccagg gtgtttagcc cttggaaccg cagttggttc ctatctct 358

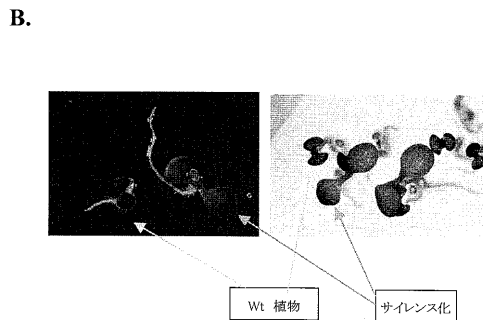
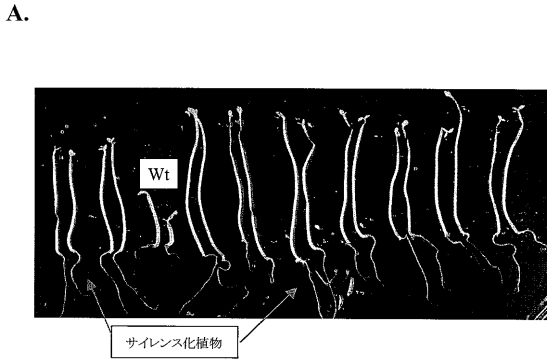
【 図 1 】



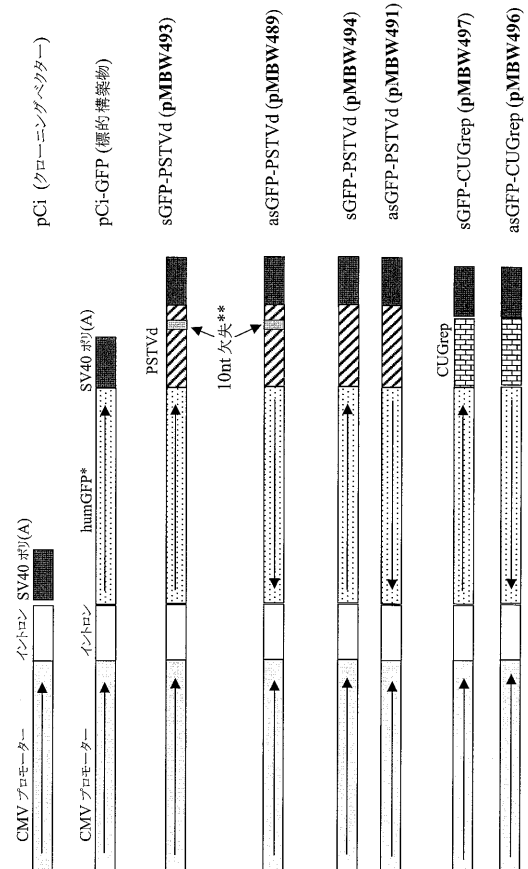
【 図 2 】



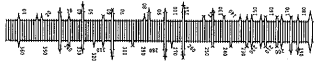
【 図 3 】



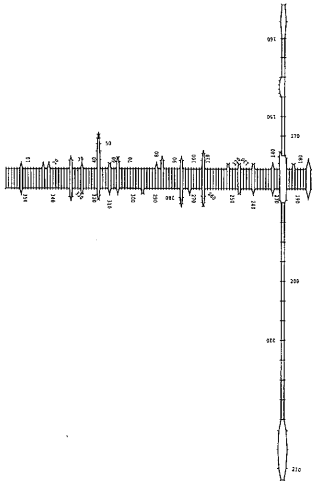
【 図 4 】



【 図 5 】



A.



B.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU03/00292
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12N 15/11		
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) IPC (WPIDS) AND CHEMICAL ABSTRACTS		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SEE BELOW		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, CA, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	The Plant Journal (2001) 27(6), Wesley et al., "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants", pages 581-90	2-14, 25-37, 42-54, 83-95, 103-115, 122- 134
Y	Journal of General Virology (2001) 82, Zhao et al., "Use of a vector based on <i>Potato virus X</i> in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of <i>Potato spindle tuber viroid</i> ", pages 1491-7	2-12, 25-35, 42-52, 83-93, 103-113, 122- 132
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94, Davis et al., "Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts", pages 7388-93	13, 14, 36, 37, 53, 54, 94, 95, 114, 115, 133, 134
<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	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 23 April 2003		Date of mailing of the international search report 5 - MAY 2003
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustrialia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer CHRISTOPHER LUTON Telephone No : (02) 6283 2256

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU03/00292

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nucleic Acids Research (2001) 29(11), Papaefthimiou et al., "Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing", pages 2395-2400	2-14, 25-37, 42-54, 83-95, 103-115, 122-134
A	Molecular Plant-Microbe Interactions (2001) 14(11), Itaya et al., " <i>Potato spindle tuber viroid</i> as Inducer of RNA Silencing in Infected Tomato", pages 1332-4	2-14, 25-37, 42-54, 83-95, 103-115, 122-134

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU03/00292

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos : 1, 15-24, 38-41, 55-82, 96-102, 116-121, 135-138 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: See supplemental box
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU03/00292

Supplemental Box

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: I

Claims 1, 15-24, 38-41, 55-82, 96-102, 116-121, 135-138 do not define the matter for which protection is sought in terms of the technical features of the invention (see Rule 6.3(a), Part B: Rules Concerning Chapter I of the Treaty). The specification, when read as a whole, indicates that the invention relates to the use of either viroid sequences or trinucleotide repeat sequences to target the antisense RNA to the nucleus. Claims 1, 15-24, 38-41, 55-82, 96-102, 116-121 and 135-138 are not limited to the use of such sequences and therefore do not define the subject matter for which protection is sought in terms of the technical features of the invention.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 5/10 C 1 2 N 5/00 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

(74)代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

(72)発明者 ワン, ミン - ボ
 オーストラリア国 2 6 1 2 エーシーティ, ターナー, マッソン ストリート 3 / 1 4

(72)発明者 ウォーターハウス, ピーター
 オーストラリア国 2 6 0 2 エーシーティ, オコーナー, バンジン ストリート 5

Fターム(参考) 2B030 AA02 AA03 AB04 AD20 CA14 CA17 CB02
 4B024 AA01 AA08 CA01 CA11 EA10 FA02 GA11 HA17 HA20
 4B065 AA95Y AB01 AC20 BA02 CA60