

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年9月7日(07.09.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/118092 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01) C12N 7/04 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/054967
- (22) 国際出願日: 2012年2月28日(28.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-044379 2011年3月1日(01.03.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社(TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 Shiga (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 井上 晃一 (INOUE, Koichi) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 蝶野 英人 (CHONO, Hideto) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 山川 知子 (YAMAKAWA, Satoko) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 川野 泰広 (KAWANO, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 峰野 純一 (MINENO, Junichi) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- 津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区域見1丁目3番7号 IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: FUSION PROTEIN

(54) 発明の名称: 融合タンパク質

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a fusion protein which is useful for the treatment or prevention of RNA virus infections. Provided are: a fusion protein produced by fusing a polypeptide having an affinity for viral RNA of an RNA virus to an endoribonuclease capable of cleaving single-stranded RNA in a sequence-specific manner; a nucleic acid which encodes the fusion protein; a vector which carries the nucleic acid; a method of treating or preventing retrovirus infections, comprising a step of introducing the vector into a cell; and a method of inhibiting the budding of a retrovirus using a cell having the nucleic acid introduced therein and the fusion protein. This fusion protein can inhibit the budding (production) of retrovirus particles from a retrovirus-infected cell effectively.

(57) 要約: 本発明は、RNAウイルス感染症の治療・予防に有用な融合タンパク質を提供することを目的とする。RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドが一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼに融合してなる融合タンパク質、当該融合タンパク質をコードする核酸、当該核酸を含むベクター、当該ベクターを細胞に導入する工程を含むレトロウイルス感染症の治療又は予防方法、前記核酸が導入されてなる細胞及び前記融合タンパク質を利用したレトロウイルスの出芽抑制方法を提供する。本発明の融合タンパク質は、レトロウイルス感染細胞からのレトロウイルス粒子の出芽(産生)を効果的に抑制することができる。



WO 2012/118092 A1

明 細 書

発明の名称： 融合タンパク質

技術分野

[0001] 本発明は、ウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドが一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼに融合されてなる融合タンパク質に関する。

背景技術

[0002] ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus; HIV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、インフルエンザウイルス、SARSウイルス等の病原性が高いRNAウイルスによる感染症が問題となっている。特にHIVは開発途上国において急速に感染が拡大しており、社会問題化している。

[0003] HIVは、CD4分子を発現する細胞に感染し、破壊する。このため、HIVの感染を受けたヒトの体内では免疫を統御する中枢細胞であるCD4陽性のヘルパーT細胞やマクロファージが減少し、ついには重度の免疫不全状態に陥ってカリニ肺炎のような日和見感染症を発症する。この状態は後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) と称されている。

[0004] HIV感染症の治療方法として、HIVの生活環を遮断する抗ウイルス剤 (逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤等) の開発が行われており、いくつかの抗ウイルス剤はすでに実用化されている。しかし、HIVは変異頻度が高いため、HIVが感染した個体内で抗ウイルス剤に耐性を持つ変異体が出現することがある。また、RNAデコイやリボザイムのような核酸、トランスドミナント変異タンパクや細胞内抗体のようなタンパク質を有効成分としてHIVの増殖を阻止する遺伝子治療薬を開発する試みもなされているが、いまだ完成の域には達していない。また、既存の抗ウイルス薬により治療効果が得られていた感染患者であっても、高齢化に伴うT細胞の再構築能の

低下等のために、抗ウイルス薬の効果が低下する可能性が懸念されている。特に米国でのHIV感染患者の高齢化が進む中、新たな治療法の開発が急務である。別のアプローチとして、HIV感染細胞特異的に細胞死を誘導する方法が考案されている。この方法は、HIV由来のLTRプロモーターの下流に細胞毒性を示す産物をコードする遺伝子を接続するものであるが、これまでのところ臨床的に応用された例は知られていない。

[0005] 近年、HIV感染細胞特異的に一本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼを発現させる技術が考案された（例えば特許文献1、非特許文献2）。この方法では、HIVの感染にともなって発現されるTatタンパク質依存的に一本鎖RNA特異的エンドリボヌクレアーゼの発現が誘導され、HIVゲノムを含む細胞内の一本鎖RNAが分解される。この結果、当該細胞ではHIVの複製、出芽が阻止される。HIV由来のRNAが分解されてTatタンパク質の発現が停止し、かつ発現されていたTatタンパク質が細胞から消失するとエンドリボヌクレアーゼの発現も停止する。この間、細胞内のリボソームやtRNAは破壊されず、前記エンドリボヌクレアーゼの発現の停止とともに通常のタンパク質合成が再開されるため、この時点で破壊されていない細胞は増殖を再開する。特許文献1の技術は、過度にCD4陽性T細胞の減少を招かない点で、HIV感染細胞特異的に細胞死を誘導する方法と比較して有利である。

[0006] 一方、ウイルスの増殖を抑制する技術として、Capsid-Targeted Viral Inactivation（以下、CTVIと記載する）と呼ばれる技術が開発されている。これは、ウイルスのカプシドタンパク質とカルシウム依存性ヌクレアーゼとの融合タンパク質を利用して、当該融合タンパク質が取り込まれたウイルス粒子中でウイルスゲノムを分解し、ウイルス粒子の感染性を低減させる技術である。この技術は、レトロウイルスの増殖抑制にも有効であることが示されている（非特許文献1）。しかしながら、CTVIでは、ウイルス感染細胞から出芽したウイルス粒子の感染性を低減させることはできるが、ウイルス感染細胞からのウイルス粒子の出

芽およびプロウイルス形成を抑制することはできない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2007/020873号パンフレット

非特許文献

[0008] 非特許文献1：米国科学アカデミー紀要 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第92巻、第364-368頁 (1995)

非特許文献2：ヒューマン・ジーン・セラピー (Hum Gene Ther.)、第22巻、第1号、第35-43頁 (2011)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は上記の従来技術を鑑みて行われたものであり、その目的は、RNAウイルス感染症の治療・予防に有用な融合タンパク質を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドが一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼに融合されてなる融合タンパク質により、RNAウイルス感染細胞からのRNAウイルス粒子の出芽（産生）が効果的に抑制されること、さらにはRNAウイルスが細胞に感染した際の感染細胞内でのプロウイルスの形成が効果的に抑制されることを見出し、本発明を完成させた。

[0011] すなわち、本発明は、

[1] RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドが一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼに融合されてなる融合タンパク質、

[2] RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドがリンカーペプチドを介して一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌク

レアーゼに融合されてなる、[1]に記載の融合タンパク質、

[3] さらに、脂質修飾シグナルをN末端領域に有する[1]に記載の融合タンパク質、

[4] RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドが、RNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドである、[1]に記載の融合タンパク質、

[5] RNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドが、レトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドである[4]に記載の融合タンパク質、

[6] レトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドがレトロウイルスのGagタンパク質に由来する、[5]に記載の融合タンパク質、

[7] レトロウイルスのGagタンパク質が、ヒト免疫不全ウイルスに由来するGagタンパク質である[6]に記載の融合タンパク質、

[8] Gagタンパク質に由来するレトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドがヌクレオカプシドである[4]に記載の融合タンパク質、

[9] 一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼがMazFタンパク質である[1]に記載の融合タンパク質、

[10] [1]～[9]のいずれか一に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子を含む核酸、

[11] さらに、RNAウイルスのトランス作用因子により転写が誘導される転写調節配列を有し、ここで、前記の融合タンパク質をコードする遺伝子は前記の転写調節配列により発現の制御が可能な形態に配置されている[10]に記載の核酸、

[12] 転写調節配列が、Tatタンパク質および／またはRevタンパク質により転写が誘導される転写調節配列である[11]に記載の核酸、

[13] [10]に記載の核酸を含むベクター、

[14] レトロウイルスベクターである [13] に記載のベクター、
[15] [13] に記載のベクターを含む医薬組成物、
[16] [10] に記載の核酸が導入されてなる細胞、
[17] [13] に記載のベクターを細胞に接触する工程を含むRNAウイルス感染症の治療又は予防方法、並びに
[18] [1] に記載の融合タンパク質、 [10] に記載の核酸、及び [13] に記載のベクターからなる群より選択された少なくとも1種を細胞に導入する工程を含む、RNAウイルスの出芽およびプロウイルス形成の抑制方法、
に関する。

発明の効果

[0012] 本発明により、RNAウイルス感染症の治療又は予防に有用な融合タンパク質、当該融合タンパク質をコードする核酸、当該核酸を含むベクター、当該ベクターを含む医薬組成物、前記核酸が導入されてなる細胞、当該ベクターを細胞に導入する工程を含むRNAウイルス感染症の治療又は予防方法、及び本発明の融合タンパク質、核酸、ベクターから選択されるものを細胞に導入する工程を含む、RNAウイルスの出芽抑制方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例1において構築したベクターの発現系を模式的に示した図である。図中1～6は、実施例1(1)～(6)において構築したベクターの発現系をそれぞれ模式的に示す。

[図2]実施例2における蛍光顕微鏡による観察結果を示す図である。図中Aは、0.025 μ gのpBApo-CMV pur DNA、pBApo-MazF、又はpBApo-Gag-MazFをDNA導入に用いて調製した細胞(図2A中左からMock、MazF、Gag-MazFと表記)の観察結果を示し、図中Bは、0.4 μ gのpBApo-CMV pur DNA、pBApo-MazF、又はpBApo-Gag-MazFをDNA導入に用いて調製した細胞(図2B中左からMock、MazF、Gag-M

a z F と表記) の観察結果を示す。

[図3]実施例2におけるqRT-PCRによる測定結果を示す図である。図中Aは、0.025 μ gのpBApo-CMV pur DNA、pBApo-Maz F、又はpBApo-Gag-Maz FをDNA導入に用いて調製した細胞から抽出した全RNAを鋳型にqRT-PCRを行った結果(図3A中左からMock、Maz F、Gag-Maz Fと表記)を示し、図中Bは、0.4 μ gのpBApo-CMV pur DNA、pBApo-Maz F、又はpBApo-Gag-Maz FをDNA導入に用いて調製した細胞から抽出した全RNAを鋳型にqRT-PCRを行った結果(図3B中左からMock、Maz F、Gag-Mazと表記)を示す。

[図4]実施例3におけるウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

[図5]実施例4におけるウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

[図6]実施例5におけるウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

[図7]実施例5におけるフローサイトメーター解析の結果から算出したAcGF P1陽性率と、濃縮ウイルスの由来やウイルス粒子添加量との関係を示す図である。

[図8]実施例5における各宿主細胞における細胞当たりのプロウイルスDNAのコピー数を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 本明細書において「RNAウイルス」とは、ゲノムがRNAで構成されるウイルスの総称を示す。本明細書における「RNAウイルス」には、一本鎖RNAウイルス及び二本鎖RNAウイルスが含まれる。

[0015] 本明細書において「二本鎖RNAウイルス」とは、ゲノムが二本鎖RNAで構成されるウイルスの総称を示す。本明細書における「二本鎖RNAウイルス」には、ロタウイルス等のレオウイルス科に属するウイルスが含まれる。

[0016] 本明細書において「一本鎖RNAウイルス」とは、ゲノムが一本鎖RNAで構成されるウイルスの総称を示す。本明細書における「一本鎖RNAウイ

ルス」には、一本鎖（＋）RNAウイルス、一本鎖（－）RNAウイルス、及びレトロウイルスが含まれる。

[0017] 本明細書において「一本鎖（＋）RNAウイルス」とは、生活環にDNAステージを有さないゲノムRNA自体がmRNAとして機能し得る一本鎖RNAウイルスの総称を示す。本明細書における「一本鎖（＋）RNAウイルス」には、A型肝炎ウイルスや口蹄疫ウイルス等のピコルナウイルス科に属するウイルス、カリシウイルス科に属するウイルス、アストロウイルス科に属するウイルス、SARSウイルス等のコロナウイルス科に属するウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス及びHCV等のフラビウイルス科に属するウイルス、並びに風疹ウイルス等のトガウイルス科に属するウイルスが含まれる。

[0018] 本明細書において「一本鎖（－）RNAウイルス」とは、RNA依存性RNAポリメラーゼによってゲノムRNAを転写する生活環を有する一本鎖RNAウイルスの総称を示す。本明細書における「一本鎖（－）RNAウイルス」には、狂犬病ウイルス等のラブドウイルス科に属するウイルス、エボラウイルス等のフィロウイルス科に属するウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス等のパラミクソウイルス科に属するウイルス、インフルエンザウイルス等のオルトミクソウイルス科に属するウイルス、ブニヤウイルス科に属するウイルス、並びにラッサウイルスやD型肝炎ウイルス等のアレナウイルス科に属するウイルスが含まれる。

[0019] 本明細書において「レトロウイルス」とは、ゲノムがRNAで構成され、ゲノムRNAをDNAに変換する生活環を有するレトロウイルス科に属するRNAウイルスの総称を示す。本明細書における「レトロウイルス」には、ヒトTリンパ好性ウイルス（HTLV）やモロニー Maus 白血病ウイルス（MMLV）のようなオンコレトロウイルス及びヒト免疫不全ウイルス（HIV）やサル免疫不全ウイルス（SIV）のようなレンチウイルスが含まれる。

[0020] 本明細書において「レトロウイルスベクター」とは、レトロウイルス科に

属するオンコレトロウイルスやレンチウイルス等を基に遺伝子組換え技術により作製されたウイルス粒子を示し、オンコレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、シュードタイプベクターが含まれる。シュードタイプベクターとは、G a g タンパク質やP o l タンパク質とは由来を異にするE n v タンパク質を有する組換えレトロウイルスベクターのことを言う。

[0021] 本明細書において「RNAウイルスのウイルスRNA」とは、RNAウイルスに由来するRNAのことを示す。本明細書における「RNAウイルスのウイルスRNA」には、RNAウイルスのゲノムRNA、当該ゲノムRNAがスプライシングを受けて生成したRNA（例えば、RNAウイルスのアクセサリータンパク質の発現に寄与するRNA）、及び前記のゲノムRNAから転写されたRNAを含む。

[0022] 本明細書において「RNAウイルスのパッケージングシグナル」とは、RNAウイルスのゲノム上に存在する、ゲノムRNAのウイルス粒子への取り込みに必要なシス因子のことを示す。H I V の場合、パッケージングシグナル（ Ψ / P s i）はゲノムRNAの5'末端から約800塩基分の領域とされている。

[0023] 本明細書において「一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼ」とは、一本鎖RNAのジエステル結合をその塩基配列特異的に加水分解するエンド型のリボヌクレアーゼのことを言う。

[0024] 本明細書において「脂質修飾シグナル」（l i p i d a t i o n s i g n a l）とは、脂肪酸やイソプレノイド等の脂質の付加によるタンパク質の修飾を指令するアミノ酸配列を指す。脂質修飾シグナルとしては、例えば、ミリストイル化シグナル、パルミトイル化シグナル、ミリストイル化とパルミトイル化の二重脂質修飾シグナル、O-アシル化シグナル、並びにイソプレニル化シグナルが知られている。

[0025] (1) 本発明の融合タンパク質

本発明の融合タンパク質は、RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドが一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレ

アーゼに融合されてなる。本発明の融合タンパク質は、そのRNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドに由来するドメインにより、ウイルス粒子に取り込まれるウイルスゲノムRNA等のウイルスRNAを認識し、さらに一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼ活性によってウイルスRNAを特定の塩基配列の箇所で切断し、分解することができる。本発明の融合タンパク質は、RNAウイルスが細胞に感染した際のプロウイルスの形成を抑制することができるうえ、RNAウイルスが感染した細胞内でウイルスRNAを切断し、RNAウイルス粒子の出芽（産生）を抑制することができる。さらには、出芽（産生）したウイルス粒子内においてもRNAウイルスのウイルスゲノムを分解することにより、ウイルス粒子の感染性を低下させることができる。このため、本発明の融合タンパク質は、RNAウイルス感染症の治療又は予防に有用である。

[0026] RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドとしては、本発明を特に限定するものではないが、RNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドが例示される。本発明には、一本鎖RNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドがより好適であり、レトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドがさらにより好適である。

[0027] 上記のレトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドを構成するアミノ酸配列としては、レトロウイルスのGagタンパク質に由来するアミノ酸配列、例えばヒト免疫不全ウイルスのGagタンパク質に由来するアミノ酸配列を好適に使用することができる。当該Gagタンパク質に由来するアミノ酸配列としては、ヌクレオカプシドが例示される。本明細書においてヌクレオカプシドとは、レトロウイルスのGagタンパク質を構成するポリペプチドの一つであり、Gagタンパク質によるパッケージングシグナルの特異的認識に関与するポリペプチドのことを指す。ヌクレオカプシドは、2つのジンクフィンガーモチーフによりパッケージングシグナルの二次構造を認識する。

[0028] RNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドのアミノ酸配列としてヌクレオカプシドに由来するアミノ酸配列を使用する場合、天然のヌクレオカプシドを構成するアミノ酸配列の全長を利用してもよいし、その断片や変異体を構成するアミノ酸配列を利用してもよい。天然のヌクレオカプシドを構成するアミノ酸配列としては、例えば、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）由来のヌクレオカプシドのアミノ酸配列（RefSeq Acc. No. NP_057850.1）が挙げられる。本発明に利用可能なヌクレオカプシドの断片や変異体としては、レトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すものであれば特に限定はないが、ヌクレオカプシドに由来する2つのジンクフィンガーモチーフを含む断片や変異体、あるいは天然のヌクレオカプシドを構成するアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／又は挿入されてなるアミノ酸配列からなるポリペプチドが例示される。例えば、天然のヌクレオカプシドを構成するアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが例示される。

[0029] 本発明の融合タンパク質は、さらにミリスチル化シグナル等の脂質修飾シグナルをN末端領域に有していてもよい。例えば、Gagタンパク質の細胞膜へのターゲティングに重要と考えられているマトリックスドメイン（MA）のミリスチル化シグナルをN末端領域に配置した本発明の融合タンパク質は、細胞膜に局在することができる。RNAウイルス感染細胞の細胞膜に本発明の融合タンパク質が局在した場合、RNAウイルスの出芽とともに前記融合タンパク質がRNAウイルス粒子内に取り込まれる。こうすることにより、仮にRNAウイルス感染細胞からRNAウイルス粒子が出芽しても、そこに取り込まれた本発明の融合タンパク質により、当該RNAウイルス粒子の感染性を低減させることができる。さらに、本発明の融合タンパク質は、上記の脂質修飾シグナルに加えて、Gagタンパク質の細胞膜へのターゲティングに寄与すると考えられているGagタンパク質のN末端近傍

の塩基性領域を有していてもよい。Gagタンパク質が一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼに融合してなる融合タンパク質は、本発明の好適な態様の一つである。

[0030] 本発明の融合タンパク質は、RNAウイルス感染症の治療又は予防に使用することができる。この場合、RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドは、治療又は予防の対象とする疾患の原因となるRNAウイルスの種類に応じて適宜選択することができる。本発明を特に限定するものではないが、本発明の融合タンパク質をHIV感染症の治療又は予防に使用する場合、例えばHIVのヌクレオカプシドをレトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドとして利用すればよい。

[0031] 本発明の融合タンパク質における一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼは、前記活性を有するリボヌクレアーゼであれば特に限定はない。例えば、二本鎖RNAやRNA-DNAハイブリッド等の二本鎖核酸を切断できないリボヌクレアーゼが例示される。リボソーム非依存的に一本鎖RNAを配列特異的に分解するエンドリボヌクレアーゼは本発明に特に好ましい。本発明には微生物由来のエンドリボヌクレアーゼ、例えば、トキシン-アンチトキシン系のトキシンを構成するエンドリボヌクレアーゼであるMazF、PemK、MqsR、Nitrosomonas europaea ATCC 19718株由来NE1181ポリペプチド、Deinococcus radiodurans R1株由来DR0662ポリペプチド等を本発明の融合タンパク質に使用することができる。MazFは一本鎖RNA中の5'-A/C A-3'の配列を、PemKは主に5'-U/A (C, A or U)-3'を切断する酵素である。また、MqsRは5'-GCU-3'の配列、NE1181ポリペプチドは5'-AAAU-3'の配列、DR0662ポリペプチドは5'-UUCCUUU-3'の配列で、それぞれ一本鎖RNAを切断する。さらに、公知のデータベースから前記のMazFやPemKのアミノ酸配列との間に高い相同性（例えば50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上の相同性）を有す

るポリペプチドを選択し、そこから一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼを有するポリペプチドを見出したうえで、当該ポリペプチドのアミノ酸配列を本発明の融合タンパク質に利用してもよい。既に藍藻類や古細菌を含む多数の微生物から、一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドが見出されている（国際公開第2006/123537号パンフレット、国際公開第2007/010740号パンフレット、国際公開第2007/013264号パンフレット、国際公開第2007/013265号パンフレット等）。

[0032] トキシン-アンチトキシン系のトキシンを構成するエンドリボヌクレアーゼは、ヒト胎盤由来リボヌクレアーゼインヒビターのような細胞質リボヌクレアーゼインヒビターによって阻害されることがないので、本発明の融合タンパク質に利用される一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼとして適している。

[0033] 本発明では、一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼとして、前記の活性を有する天然のエンドリボヌクレアーゼを構成するアミノ酸配列の全長を利用してもよいし、その断片や変異体を構成するアミノ酸配列を利用してもよい。本発明にそのアミノ酸配列が利用可能なエンドリボヌクレアーゼの断片や変異体としては、一本鎖RNAを配列特異的に切断する活性を有するものであれば特に限定はないが、天然のエンドリボヌクレアーゼを構成するアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、及び／又は挿入されてなるアミノ酸配列からなるポリペプチドが例示される。前記の断片や変異体としては、天然のエンドリボヌクレアーゼを構成するアミノ酸配列〔例えば天然のMazFを構成するアミノ酸配列（RefSeq Acc. No. NP_417262）〕と90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列のものが例示される。

[0034] 本発明の融合タンパク質において、RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドは、一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリ

ボヌクレアーゼに対してC末端側に配置されていても、N末端側に配置されていてもよく、その両側に配置されていてもよい。

[0035] 本発明の融合タンパク質は、RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドと一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼとをつなぐリンカーペプチドを有していてもよい。例えば、レトロウイルス由来のヌクレオカプシドがリンカーペプチドを介して一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼに融合してなる融合タンパク質は、本発明の好適な態様の一つである。

[0036] リンカーペプチドは、それを介して融合される両ポリペプチドの機能発揮への影響を考慮して適宜選択可能であり、特に限定はない。本発明に使用されるリンカーペプチドとして例えばアラニンリンカー、セリン-グリシンリンカー、及びプロテアーゼ認識配列を有するリンカーペプチドが例示される。例えば、本発明の融合タンパク質におけるRNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドとしてHIV由来のGagタンパク質を利用する場合、リンカーペプチドとしてHIVプロテアーゼの認識配列を有するポリペプチドを利用してもよい。こうすることにより、本発明の融合タンパク質がウイルス粒子に封入された際に、ウイルス粒子内で遊離のエンドリボヌクレアーゼを生成させることができる。

[0037] (2) 本発明の核酸

本発明の核酸は、本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子を含む。本発明の核酸を導入した細胞は、本発明の融合タンパク質の製造に使用することができる。また、本発明の核酸を適切なベクターによってレトロウイルス感染細胞等のRNAウイルス感染細胞内に導入することにより、RNAウイルス感染細胞からのRNAウイルス粒子の出芽（産生）を抑制することができる。また、RNAウイルス感染細胞より出芽するRNAウイルス粒子の感染性を低下させることができる。さらには、本発明の核酸が導入された細胞は、RNAウイルスが感染した際のプロウイルスの形成が抑制される。

[0038] 本発明の核酸の核酸配列は、本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子

を含むものであれば特に限定はないが、本発明の核酸から発現される融合タンパク質のエンドリボヌクレアーゼ活性によって切断される核酸配列を含まないように設計することが好ましい。

[0039] 好適な態様において、本発明の核酸は、RNAウイルスのトランス作用因子により転写が誘導される転写調節配列と、前記配列により発現の制御が可能な形態に配置された本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子とにより構成される。

[0040] この態様において、本発明の核酸が導入された細胞や当該細胞から分化した細胞は、RNAウイルスの感染を受けて細胞内にRNAウイルス由来のトランス作用因子が生成した際に、転写調節配列の下流に位置する本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子の発現が誘導され、細胞内に本発明の融合タンパク質が発現する。発現した本発明の融合タンパク質によりRNAウイルスのウイルスRNAは分解される。その結果、RNAウイルス感染細胞内でのプロウイルスの形成、ウイルスゲノムの複製、ウイルスタンパク質の合成、及びウイルス感染細胞からのRNAウイルス粒子の出芽（産生）が抑制される。さらには、RNAウイルス感染細胞からRNAウイルス粒子が出芽した場合においても、RNAウイルス粒子の感染性が低減される。

[0041] RNAウイルスのトランス作用因子により転写が誘導される転写調節配列には特に限定はないが、例えば、HIVのTatタンパク質により転写が誘導される転写調節配列のような、レトロウイルスのトランス作用因子により転写が誘導される転写調節配列を使用することができる。Tatタンパク質は、HIVのLTRプロモーターの作用により転写が開始されたRNA内に存在するTAR (trans-activation responsive element) 配列に結合し、それより下流の転写を活性化することから、転写開始点の下流にTAR領域の塩基配列を有する転写調節配列を本発明の核酸に使用することができる。特に好適には、HIVのLTRや、前記LTRに適切な改変を施した転写調節配列が使用される。前記の改変としては、例えばプロモーター内に存在する宿主細胞由来の転写因子との結合部

位の欠失やT a t 特異的な転写に不要な領域の欠失が例示される。前者の改変により、宿主由来転写因子による、H I V感染とは無関係な転写のレベルを低下させることが可能である。また、後者の改変としてL T RのU 5領域やT A R配列より下流の領域（R領域の一部及びU 5領域）の欠失が例示される。このような欠失L T Rを有する本発明の核酸は、当該核酸を保持する高タイトーのレトロウイルスベクターを作製する際に有利である。

[0042] また、H I Vゲノムに存在するR R E（R e v - r e s p o n s i b l e e l e m e n t）は、H I V由来のトランス作用因子であるR e vタンパク質との相互作用によってタンパク質の発現を促進することが知られている。さらに、g a g、p o l 遺伝子内に存在するI N Sと呼ばれる領域は、R e vタンパク質の非存在下ではH I Vのm R N Aの転写を抑制しているが、前記のR R E及びR e vタンパク質との相互作用によってこの抑制作用が解除されることが知られている [ジャーナル・オブ・ウイルス学（J. V i r o l.）、第66巻、p 7 1 7 6 - 7 1 8 2（1992）]。したがって、本発明の核酸において、本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子の3'側にこれらの転写調節配列を組み込むことにより、本発明の融合タンパク質をR e vタンパク質依存的に、すなわちH I V感染依存的に発現させることができる。

[0043] 前記のR N Aウイルス由来のトランス作用因子と相互作用する配列は、当該配列が本来的に組み込まれている機能的配列、例えばプロモーターとともに使用してもよく、異種の機能的配列と組み合わせて使用してもよい。例えば、本発明の核酸の導入が望まれる細胞においてm R N Aの転写を開始する、R N Aウイルス由来ではないプロモーター及び前記のR N Aウイルス由来のトランス作用因子と相互作用する配列を組み合わせて構築された配列も、本発明に使用される「転写調節配列」に包含される。

[0044] (3) 本発明のベクター

本発明のベクターは、本発明の核酸を含むベクターである。本発明のベクターは、本発明の核酸からのR N Aの転写を達成するためのプロモーター及

び転写開始部位、ならびにこれらの因子と協働する他の調節要素、例えば、エンハンサーやオペレーター配列を有していても良い。さらに、本発明の核酸の下流にターミネーター配列を含有することができる。また、本発明のベクターは、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を有していてもよい。マーカー遺伝子としては、例えば、細胞に抗生物質に対する耐性を付与する薬剤耐性遺伝子や、蛍光タンパク質をコードする遺伝子、酵素活性の検出によって遺伝子導入された細胞を見分けることができるレポーター遺伝子が利用できる。さらに、本発明のベクターは、遺伝子導入細胞による治療が完遂した場合、あるいは何らかの副作用が生じた場合に生体内から遺伝子導入細胞を排除する目的で、自殺遺伝子を搭載していても良い。

[0045] 本発明のベクターの種類に特に限定はないが、プラスミドベクターやウイルスベクターが例示される。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターが例示される。本発明の核酸を染色体上に組み込む能力を有するレトロウイルスベクターは、本発明のベクターとして好適である。

[0046] 本発明のベクターとして利用可能なレトロウイルスベクターとしては、例えば、モロニー白血病ウイルス (MMLV) に基づくベクター等のオンコレトロウイルスベクター、ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) に基づくベクターやサル免疫不全ウイルス (SIV) に基づくベクター等のレンチウイルスベクターが例示される。これらベクターは、エンベロープとして異種のウイルス由来のエンベロープを用いることによってシュードタイプ化しても良い。ここで、シュードタイプベクターとしては、水泡性口内炎ウイルス (VSV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、ネコ内因性ウイルス RD114、マウス白血病ウイルス (Ecotropic-env、amphotropic-env、10A1-env等) 等のEnvタンパク質を有するオンコレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが例示される。また、複製能欠損組換えレトロウイルスベクターは、本発明のベクター

の好適な態様の一つである。該ベクターは、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させてあり、非病原性である。公知の複製能欠損レトロウイルスベクターとしては、MFGベクター（ATCC No. 68754）、 α -SGCベクター（ATCC No. 68755）、LXSNベクター [バイオテクニクス (BioTechniques)、第7巻、第980~990頁 (1989年)]、タカラバイオ社製のDON-5、DON-A1-2、ME1-5レトロウイルスベクター、クロンテック社製のRet्रो-X Qベクターシリーズ、Lenti-Xベクターシリーズ等が例示される。また、RNAウイルス感染細胞において制限的に複製できるレトロウイルスベクターも本発明のベクターの好適な態様の一つである。該ベクターは、RNAウイルスが感染した細胞中で選択的に複製し、治療効果のある融合タンパク質遺伝子が伝搬される。

[0047] 一般的なレトロウイルスベクターの産生方法としては、あらかじめgag-pol遺伝子、env遺伝子等のレトロウイルスの構造タンパク質をコードする遺伝子が染色体上に組み込まれたレトロウイルスパッケージング細胞に、外来遺伝子とパッケージングシグナルを搭載したトランスファーベクターを導入することによって産生させる方法、及びレトロウイルスの構造タンパク質を有さない細胞に、gag-pol遺伝子やenv遺伝子等のレトロウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子を有するパッケージングプラスミドと同時に、前記のトランスファーベクターをトランスフェクションして産生させる方法が挙げられる。

[0048] 本発明のベクターとしては、レトロウイルスベクター産生用のトランスファーベクターとして使用されるものも例示される。トランスファーベクターとして使用される本発明のベクターとしては、プラスミドベクターが好適に例示される。

[0049] 本発明のベクターは、本発明の核酸を転写するためのユニットをレトロウイルスベクターのRNAゲノムの転写方向に対して逆向き、すなわち、本発明の核酸の転写調節配列より開始される転写の向きをレトロウイルスベクタ

一の5' -LTRより開始される転写の向きと反対となるようにレトロウイルスベクター内に配置してもよい。この構成を採用すれば、本発明のベクターから転写されるレトロウイルスmRNAは本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子のアンチセンス鎖に相当するため、このレトロウイルスmRNAから本発明の融合タンパク質の発現が抑えられる。また、前記転写調節配列の特性に起因する、本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子からの微弱な転写があったとしても、レトロウイルスmRNAがアンチセンスRNAとして機能することで本発明の融合タンパク質の発現が抑制される。このため、本態様のベクターをレトロウイルスベクター産生用のトランスファーベクターとして使用することにより、高い力価のレトロウイルスベクターを得ることができる。さらに、本発明の融合タンパク質における一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼが、トキシン-アンチトキシン系のトキシンである場合、当該レトロウイルスベクターを産生する細胞として、アンチトキシン産生株を使用することにより、高い力価のレトロウイルスベクターを得ることができる。

[0050] また、本発明のレトロウイルスベクターは、ベクターから転写されるRNAが本発明の融合タンパク質によって認識されないようにするため、本発明の融合タンパク質におけるRNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドとは由来が異なるパッケージングシグナルを有していてもよい。例えば、レンチウイルス（例えばHIV）由来のヌクレオカプシド及びエンドリボヌクレアーゼからなる融合タンパク質をコードする遺伝子、並びにオンコレトロウイルス（例えばMMLV）由来のパッケージングシグナルを含むレトロウイルスベクターは、本発明のベクターの好適な態様の一つである。

[0051] (4) 本発明の疾病の治療又は予防方法

本発明の疾病の治療又は予防方法は、本発明のベクターを細胞に導入する工程を含み、レトロウイルス感染症等のRNAウイルス感染症の治療又は予防に有用である。本発明の治療又は予防方法が有効なRNAウイルス感染症

としては、例えば、A型肝炎、口蹄疫、重症急性呼吸器症候群（SARS）、ウエストナイル熱、黄熱病、日本脳炎、C型肝炎、風疹、狂犬病、エボラ出血熱、流行性耳下腺炎、インフルエンザ、ラッサ熱、D型肝炎、AIDSを含むHIV感染症、及び成人T細胞白血病が挙げられる。なお、これらの疾患等の治療又は予防のための本発明のベクターを含む医薬組成物は、本発明の一態様である。

[0052] 本発明の疾病の治療又は予防方法により、例えばヒト免疫不全ウイルス感染症の治療又は予防を行う場合、本発明のベクターは、HIVが感染する可能性のある細胞、すなわちCD4陽性細胞を含む細胞（細胞群）に導入されることが望まれる。したがって、本発明の治療又は予防方法では、CD4陽性細胞（例えばT細胞）やCD4陽性細胞に分化しうる前駆細胞（例えば造血幹細胞）、あるいは前記の細胞を含有する細胞集団を標的細胞として遺伝子導入が実施される。HIVの感染を受ける可能性のある細胞に網羅的に前記の核酸構築物を導入する観点から、本発明では造血幹細胞又は当該細胞を含有する細胞集団を標的とすることが好ましい。前記の細胞は、CD4陽性細胞やその前駆細胞を含有するものであれば特に限定はなく、個体より採取された血液細胞（末梢血細胞、臍帯血細胞）、骨髓細胞や、前記の細胞から公知方法により分画されたCD4陽性細胞、CD4陽性細胞の前駆細胞、造血幹細胞等が例示される。

[0053] 本発明のベクターを細胞に導入する方法には特に限定はない。例えば、本発明のベクターとしてプラスミドベクターを使用する場合は、リン酸カルシウム法、カチオニック・リピド法、リポソーム法、エレクトロポレーション法等の遺伝子導入法が使用できる。本発明のベクターとして、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等のウイルスベクターを用いる場合には、各ウイルスに適した条件で目的の細胞に感染させればよい。こうして本発明のベクターにより本発明の核酸が導入されてなる細胞も、本発明の一態様である。

[0054] 本発明の治療又は予防方法の一態様としては、生物個体より採取された細

胞に生体外でベクターを導入するエクス・ビボ (e x v i v o) 遺伝子導入が例示される。ウイルスベクターを使用する場合、生体より採取された前記の標的細胞とウイルスベクター、例えばウイルス産生細胞の培養液上清や前記上清から精製されたウイルスベクターとを混合し、適切な条件でインキュベートすることにより、遺伝子の導入が達成される。こうして遺伝子導入された細胞を生物個体に投与することにより、当該生物個体の免疫不全ウイルス感染症等の治療又は予防を行うことができる。イン・ビボ (i n v i v o) で遺伝子導入可能なベクター、例えばアデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターを使用する場合には、本発明の核酸を含有するベクターを個体に直接投与してもよい。

[0055] レトロウイルスベクターをエクス・ビボ遺伝子導入に使用する場合、レトロウイルス結合活性を有する機能性物質の存在下に標的細胞にレトロウイルスベクターを高効率で感染させることができる。

[0056] レトロウイルス結合活性を有する機能性物質を使用する遺伝子導入方法は、例えばWO 95/26200号国際公開パンフレット、WO 97/18318号国際公開パンフレット、Nature Medicine、第2巻、第876-882頁(1996)等に記載されている。当該方法には、レトロウイルス結合部位と標的細胞結合部位の両方を同一分子上に有する機能性物質を使用する方法、レトロウイルス結合部位を有する機能性物質と標的細胞結合部位とを有する機能性物質との混合物を使用する方法とがあり、いずれの方法も本発明に使用することができる。

[0057] 前記のレトロウイルス結合活性を有する機能性物質としては、細胞接着ドメインとヘパリン結合ドメインの両者を有するフィブロネクチンフラグメントが好適に例示される。当該フィブロネクチンフラグメントは、生体より精製されたフィブロネクチンからプロテアーゼ消化などの手段で調製することができ、また、組換えDNA技術により作製することができる。例えば、レトロネクチン(登録商標)としてタカラバイオ社から発売されている組換えフィブロネクチンフラグメントは、レトロウイルス結合活性を有する機能性

物質を使用する遺伝子導入方法に好適に使用できる。

[0058] 本発明の治療又は予防方法の上記とは異なる態様としては、本発明の融合タンパク質を直接生物個体に投与する方法が例示される。このとき、投与される本発明の融合タンパク質は、精製されたタンパク質そのものや、アジュバント等により封入されたもの、ウイルス様粒子に封入されたものであっても良い。

[0059] 本発明の治療又は予防方法は、単独で実施してもよいが、3～4種類の抗ウイルス薬（逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤等）を併用する多剤併用療法（H A A R T）と組み合わせて実施しても良い。

[0060] 上記のとおり、本発明の融合タンパク質、ベクター、ならびに当該ベクターが導入された細胞はRNAウイルス感染症の治療、予防のために使用することができる。すなわち、本発明はRNAウイルス感染症の治療、予防のための医薬組成物を提供する。前記の医薬組成物は、本発明のベクターまたは当該ベクターにより本発明の核酸が導入された細胞を有効成分として含有するものであれば特に限定するものではないが、当該有効成分自体の他、当該有効成分を薬学的に許容される担体と組み合わせて調製される製剤、当該ベクターとエキス・ピボで細胞へ遺伝子導入を行うための試薬を組み合わせたキット等、任意の形態をとることができる。

実施例

[0061] 以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0062] 実施例1 発現プラスミドの構築

(1) pBApo-Gag-MazFの構築

配列表の配列番号：1に記載の核酸配列からなるDNA断片が哺乳動物用ベクターpBApo-CMV pur DNA（タカラバイオ社製）のBamHIサイトとHindIIIサイトの間に挿入されてなるプラスミドpBApo-Gag-MazFを構築した。pBApo-Gag-MazFは、HIV-1のGagタンパク質と一本鎖RNA配列特異的なエンドリボヌク

レアーゼであるMazFとがHIVプロテアーゼの認識配列を含むリンカーペプチドを介して融合されてなる融合タンパク質を、CMVプロモーター／エンハンサーの制御下に発現可能なプラスミドである（図1）。pBAPo-Gag-MazFより発現される融合タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号：2に示す。なお、配列番号：1は、5′末端側のBamHIサイトと3′末端側のHindIIIサイトを含む塩基配列を、pBAPo-Gag-MazFにおける挿入断片の核酸配列として示している。配列番号：1に記載の核酸配列におけるHIV-1のGagをコードする塩基配列は、天然のHIV-1のGag遺伝子の配列をヒトのコドンに最適化したものである。また、MazFをコードする塩基配列は、天然のmazF遺伝子（RefSeq Acc. No. NC_000913中、2908778番目～2909113番目の核酸配列の相補鎖配列）の塩基配列に存在するMazFの認識配列であるACAをアミノ酸置換が生じないように他の配列に改変した人工合成配列である（ACA-less mazF遺伝子；配列表の配列番号：5）。

[0063] (2) pBAPo-Gag (G2A) -MazFの構築

pBAPo-Gag-MazFにおける配列番号：1に記載の核酸配列の5′末端から17番目のグアニンに相当する塩基がシトシンであることを除いてpBAPo-Gag-MazFと同じ核酸配列からなるプラスミドpBAPo-Gag (G2A) -MazFを構築した。pBAPo-Gag (G2A) -MazFは、Gagタンパク質のN末端から2番目のグリシン残基がアラニン残基に変異したGag (G2A) とMazFとの融合タンパク質を、CMVプロモーター／エンハンサーの制御下に発現可能なプラスミドである（図1）。Gagタンパク質のN末端から2番目のグリシン残基は、Gagの細胞膜へのターゲティングに重要と考えられているミリストイル化修飾を受けるアミノ酸残基である。Gag (G2A) は、このミリストイル化修飾部位を欠損させた変異体である。

[0064] (3) pBAPo-Gag (Δ NC) -MazFの構築

pBAp o-G a g-M a z Fにおける配列番号：1に記載の核酸配列の5'末端から1156番目から1299番目に相当する核酸配列が欠失していることを除いてpBAp o-G a g-M a z Fと同じ核酸配列からなるプラスミドpBAp o-G a g (ΔNC) -M a z Fを構築した。pBAp o-G a g (ΔNC) -M a z Fは、G a gタンパク質のヌクレオカプシドタンパク質 (NC) の領域のアミノ酸配列が欠失したG a g (ΔNC) とM a z Fとの融合タンパク質をCMVプロモーター／エンハンサーの制御下に発現可能なプラスミドである (図1)。

[0065] (4) pBAp o-G a g (Δ2-31) -M a z Fの構築

pBAp o-G a g-M a z Fにおける配列番号：1に記載の核酸配列の5'末端から16番目から105番目に相当する核酸配列が欠失していることを除いてpBAp o-G a g-M a z Fと同じ核酸配列からなるプラスミドpBAp o-G a g (Δ2-31) -M a z Fを構築した。pBAp o-G a g (Δ2-31) -M a z Fは、G a gタンパク質のN末端から2番目のグリシン残基から31番目のロイシン残基までのアミノ酸配列が欠失したG a g (Δ2-31) とM a z Fとの融合タンパク質をCMVプロモーター／エンハンサーの制御下に発現可能なプラスミドである。G a g (Δ2-31) は、G a gの細胞膜へのターゲティングに重要と考えられているミリスチル化修飾部位及びN末端近傍の塩基性領域を欠損させた変異体である。

[0066] (5) pBAp o-M a z Fの構築

大腸菌由来のm a z F遺伝子 (Ref Sec Acc. No. Ref Sec Acc. No. NC_000913中、2908778番目～2909113番目の核酸配列の相補鎖配列) 中に存在するACAの塩基配列を、天然のM a z Fのアミノ酸配列を変化させることなしに他の塩基配列に変換した人工合成配列 (ACA-less m a z F遺伝子；配列表の配列番号：5) を鋳型にして、プライマーm a z F (HindIII) __R (配列表の配列番号：3) とプライマーm a z F (BamHI) __F (配列表

の配列番号：4) とを用いてPCR増幅した。得られたPCR産物を制限酵素BamHIとHindIIIで消化後、同酵素で消化した前記プラスミドpBApo-CMV pur DNAに挿入した。こうして構築されたプラスミドをpBApo-MazFと命名した。pBApo-MazFは、CMVプロモーター／エンハンサーの制御下にMazFタンパク質を発現することができるプラスミドである(図1)。

[0067] (6) pBApo-NC-MazFの構築

実施例1(5)で得られたPCR産物を制限酵素BamHIとHindIIIで消化後、同酵素で消化したpUC19プラスミドDNAに挿入した。こうして構築されたプラスミドをpUC-MazFと命名した。次に、Gag遺伝子のNC領域のアミノ酸配列(配列表の配列番号：6)をコードする塩基配列をプライマーNC-Fw(配列表の配列番号：7)とプライマーNC-Rev3(配列表の配列番号：8)とを用いてPCR増幅後、制限酵素BamHIとNcoIで消化し、さらに同酵素で消化したpUC-MazFプラスミドに挿入した。得られたプラスミドを制限酵素BamHIとHindIIIで消化することによってNC-MazF DNA断片を切り出し、同酵素で処理したpBApo-CMV purプラスミドに挿入した。こうして構築されたプラスミドをpBApo-NC-MazFと命名した。前記プラスミドは、CMVプロモーター／エンハンサーの制御下にNCとMazFの融合タンパク質(NC-MazF)を発現することができるプラスミドである(図1)。

[0068] 実施例2 本発明の融合タンパク質によるウイルスRNAの分解

(1) 融合タンパク質発現ベクター導入細胞の調製

コラーゲンコート処理した6cmディッシュに10%ウシ胎仔血清(GIBCO社製)を含有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM;シグマ社製)4mLを添加し、さらに 2×10^6 個のヒト293T/17細胞(ATCC CRL-11268)を添加し、24時間培養した。次いで各ディッシュの細胞にレンチウイルスパッケージングミックス(インビトロジェ

ン社製)、pLenti6.3/V5ベクター(インビトロジェン社製)にZsGreen1遺伝子を挿入することにより構築されたプラスミドpLenti-ZsGreen、pBApo-CMV pur DNAにHIV-1由来Tat遺伝子を挿入することにより構築されたpBApo-Tat、及びpBApo-CMV pur DNAを、TransIT-293(ミラス社製)を用いて当該製品の説明書の記載に従って導入した。こうして調製した細胞をコントロール細胞(Mock細胞)とした。なお、Mock細胞は、0.025 μ gのpBApo-CMV pur DNAを導入に使用したものと、0.4 μ gを導入に使用したものの2種類を調製した。

[0069] また、pBApo-CMV pur DNAの代わりに実施例1(5)で構築したpBApo-MazF、又は実施例1(1)で構築したpBApo-Gag-MazFを導入する以外は上記のMock細胞の調製と同様の方法で細胞を調製し、それぞれの導入・発現細胞をMazF細胞、及びGag-MazF細胞とした。なお、MazF細胞及びGag-MazF細胞は、0.025 μ gのpBApo-MazF又はpBApo-Gag-MazFを導入に使用したものと、0.4 μ gのpBApo-MazF又はpBApo-Gag-MazFを導入に使用したものの2種類をそれぞれ調製した。

[0070] (2) ZsGreen1の発現確認

実施例2(1)で調製した各細胞を蛍光顕微鏡で観察した(図2)。コントロール細胞(Mock細胞)では、強いZsGreen1タンパク質由来の蛍光シグナルを検出したのに対し、MazF細胞ではコントロール細胞と比較して低い強度の蛍光シグナルを検出した。一方、Gag-MazF細胞では、ZsGreen1由来の蛍光シグナルの強度が劇的に低下した。この傾向は、細胞に導入するMazFおよびGag-MazFを発現するプラスミド量に依存していた。

[0071] (3) 細胞内ZsGreen1 RNAのqRT-PCRによる測定

実施例2(1)で調製した各細胞より常法に従って全RNAを抽出し、各細胞におけるZsGreen1をコードするRNA及び β -actinをコ

ードするRNAの発現量を、リアルタイムRT-PCR (qRT-PCR) により18S rRNA量に対する相対値を算出することにより求めた。18S rRNAのqRT-PCRにはプライマーhuman_18S_fw (配列表の配列番号：9) 及びプライマーhuman_18S_rev (配列表の配列番号：10) を、ZsGreen1をコードするRNAのqRT-PCRにはプライマーZsG_F2 (配列表の配列番号：11) 及びプライマーZsG_R2 (配列表の配列番号：12) を、β-actinをコードするRNAのqRT-PCRにはプライマーbeta_actin_fw (配列表の配列番号：13) 及びプライマーbeta_actin_rev (配列表の配列番号：14) をそれぞれ使用した。結果を表1及び図3に示す。

[0072] [表1]

細胞導入に使用したベクター量	サンプル	β-actin	ZsGreen1
0.025 μg	Mock細胞	9.2609	10.5701
	MazF細胞	9.3167	6.5934
	Gag-MazF細胞	10.6374	4.7861
0.4 μg	Mock細胞	8.5798	9.5453
	MazF細胞	10.6762	1.5943
	Gag-MazF細胞	9.2016	0.7674

18S rRNA量に対する相対値

[0073] 表1及び図3に示すとおり、MazF細胞ではZsGreen1 RNAの発現量が顕著に低下しており、Gag-MazF細胞ではZsGreen1 RNAの発現量がより顕著に低下していた。ハウスキーピング遺伝子であるβ-actin mRNAの発現量は、各細胞間において大きな違いはなかった。このことは、実施例3(1)で観察したGag-MazF発現による細胞内ZsGreen1由来の蛍光シグナル強度の著しい低下は、Gag-MazF融合タンパク質によるZsGreen1 RNAの分解に由来することを示している。

[0074] 本実施例の結果は、G a g - M a z F 融合タンパク質がRNAウイルスのパッケージングシグナルを含むRNAを効果的に分解することを示しており、G a g - M a z F 融合タンパク質がRNAウイルス感染細胞内においてウイルスRNAを効果的に分解できることを示している。

[0075] 実施例3 本発明の融合タンパク質のRNAウイルス粒子出芽阻害効果及びRNAウイルス粒子出芽阻害効果に必要な領域の同定

(1) 融合タンパク質発現ベクター導入細胞の調製

実施例2(1)と同様の方法にて、M o c k 細胞、M a z F 細胞、及びG a g - M a z F 細胞を調製した。また、p B A p o - C M V p u r D N A の代わりに実施例1(2)で構築したp B A p o - G a g (G 2 A) - M a z F、実施例1(3)で構築したp B A p o - G a g (Δ N C) - M a z F、又は実施例1(4)で構築したp B A p o - G a g (Δ 2 - 3 1) - M a z F を導入する以外は実施例2(1)のM o c k 細胞の調製と同様の方法で細胞を調製し、それぞれの導入・発現細胞をG a g (G 2 A) - M a z F 細胞、G a g (Δ N C) - M a z F 細胞、及びG a g (Δ 2 - 3 1) - M a z F 細胞とした。なお、細胞へのベクター導入の際には、0.25 μ g の p B A p o - C M V p u r D N A、p B A p o - M a z F、p B A p o - G a g - M a z F、p B A p o - G a g (G 2 A) - M a z F、p B A p o - G a g (Δ N C) - M a z F、又はp B A p o - G a g (Δ 2 - 3 1) - M a z F を使用した。

[0076] (2) 濃縮ウイルスの調製

実施例3(1)で調製した各細胞を37℃、5%CO₂の条件下で24時間培養後、培地交換を行ってさらに24時間培養した。培養終了後、培養上清を集めて0.45 μ m のフィルターでろ過し、このろ液を低速遠心(6000 × g、16 h、4℃)することにより、ウイルスをペレット化した。続いて、ペレット化したウイルスをPBSバッファーで懸濁し、20倍濃縮ウイルスを得た。

[0077] (3) 濃縮ウイルスサンプルのウェスタンブロットィング解析

実施例3 (2) で得た濃縮ウイルスをSDS入りサンプルバッファーと混合、熱処理したものを、レンチウイルス粒子の構成成分であるp24タンパク質に対する抗p24抗体(アブカム社製)を用いたウェスタンブロッティングに供した。結果を図4に示す。図4に示すとおり、MazFを発現する細胞(以下図中MazFと表記)では、コントロール細胞(Mock細胞:以下図中Mockと表記)と比べてウイルス粒子量が低下し、Gag-MazF細胞(図中Gag-MazFと表記)ではウイルス粒子量がさらに著しく低下していた。この結果から、Gag-MazF融合タンパク質には、MazFと比較してもウイルス粒子出芽(産生)の著しい阻害作用があることが分かった。

[0078] また、Gagの細胞膜への局在化に必要なミリスチル化修飾部位を欠損したGag(G2A)-MazF融合タンパク質を発現する細胞[図中Gag(G2A)-MazFと表記]やミリスチル化修飾部位、ミリスチル化シグナル及びN末端近傍の塩基性領域を欠損したGag(Δ 2-31)-MazF融合タンパク質を発現する細胞[図中Gag(Δ 2-31)-MazFと表記]では、Gag-MazF融合タンパク質を発現する細胞と同程度にウイルス粒子の出芽(産生)が著しく阻害されていた。一方、NC領域のアミノ酸配列を欠損したGag(Δ NC)-MazF融合タンパク質を発現する細胞[図中Gag(Δ NC)-MazFと表記]では、ウイルス粒子の出芽(産生)の著しい阻害は認められなかった。

[0079] 本実施例の結果は、Gag-MazF融合タンパク質によるウイルス粒子の出芽(産生)阻害効果が、融合タンパク質中のRNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドと一本鎖RNA配列特異的エンドリボヌクレアーゼによりもたらされていることを示す。

[0080] 実施例4 NC-MazF融合タンパク質によるウイルス粒子出芽阻害効果
実施例2(1)と同様の方法にて、Mock細胞、MazF細胞、及びGag-MazF細胞を調製した。また、pBApo-CMV pur DNAの代わりに実施例1(6)で構築したpBApo-NC-MazFを導入

する以外は実施例2(1)のMock細胞の調製と同様の方法でヒト293T/17細胞へのプラスミドの導入を行い、NC-MazF細胞を得た。次に、各細胞より実施例3(2)と同様の方法で濃縮ウイルスを調製し、実施例3(3)と同様の方法にてウェスタンブロッティングにより解析した。結果を図5に示す。図5に示すとおり、NC-MazF細胞(図中NC-MazFと表記)では、Gag-MazF導入細胞(図中Gag-MazFと表記)と同等のウイルス粒子出芽(産生)阻害効果が認められた。以上の結果は、RNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドと一本鎖RNA配列特異的エンドリボヌクレアーゼとが融合してなる融合タンパク質が、RNAウイルス粒子の出芽(産生)を顕著に抑制することを示す。

[0081] 実施例5 本発明の融合タンパク質のRNAウイルス粒子不活化効果

(1) 融合タンパク質発現ベクター導入細胞の調製

細胞培養用6cmディッシュに10%ウシ胎仔血清(GIBCO社製)を含有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM;シグマ社製) 4mLを添加し、さらに 1.8×10^6 個のヒトLenti-X 293T/17細胞(クロンテック社製)を添加し、24時間培養した。次いで各ディッシュの細胞にレンチウイルスパッケージングミックス(クロンテック社)、pLVX-AcGFP1-C1ベクター(クロンテック社)、pBApo-CMV pur DNAにHIV-1由来Tat遺伝子を挿入することにより構築されたpBApo-Tat、及びpBApo-CMV pur DNAを、TransIT-293(ミラス社製)を用いて当該製品の説明書の記載に従って導入した。こうして調製した細胞をコントロール細胞(Mock細胞)とした。なお、Mock細胞の調製の際には、 $0.025 \mu\text{g}$ のpBApo-CMV pur DNAを導入した。

[0082] また、pBApo-CMV pur DNAの代わりに実施例1(5)で構築したpBApo-MazF、又は実施例1(1)で構築したpBApo-Gag-MazFを導入する以外は上記のMock細胞の調製と同様の方

法で細胞を調製し、それぞれの導入・発現細胞をM a z F細胞、及びG a g - M a z F細胞とした。

[0083] (2) 濃縮ウイルスの調製

実施例5(1)で調製した各細胞を37℃、5%CO₂の条件下で24時間培養後、培地交換を行ってさらに24時間培養した。培養終了後、培養上清を集めて0.45μmのフィルターでろ過し、このろ液を低速遠心(6000×g、16h、4℃)することにより、ウイルスをペレット化した。続いて、ペレット化したウイルスをPBSバッファーで懸濁し、10倍濃縮ウイルスを得た。

[0084] (3) 濃縮ウイルスのウェスタンブロットング解析

実施例5(2)で得た濃縮ウイルスのうち、M a z F細胞より得られた濃縮ウイルス、及びG a g - M a z F細胞より得られた濃縮ウイルスをそれぞれSDS入りサンプルバッファーと混合・熱処理し、抗M a z F抗体を用いたウェスタンブロットングに供した。結果を図6に示す。図6に示すとおり、M a z F細胞より産生したウイルス(図中M a z Fと表記)からは、M a z Fタンパク質を検出することはできなかった。一方、G a g - M a z F細胞より産生したウイルス(図中G a g - M a z Fと表記)からは、遊離の状態のM a z Fタンパク質と少量のG a g - M a z Fタンパク質を検出した。この結果から、G a g - M a z Fタンパク質を発現するG a g - M a z F細胞では、ウイルス粒子内にG a g - M a z Fが効果的に封入されたと考えられる。さらに、ウイルス粒子内では、活性化したH I VプロテアーゼによりG a g - M a z FがG a gタンパク質とM a z Fタンパク質とに分断され、遊離型M a z Fタンパク質が蓄積したと考えられる。ウイルス粒子内で生成したこの遊離型M a z Fタンパク質は、活性化したH I Vプロテアーゼによる分解が認められないことから、粒子内においてリボヌクレアーゼ活性を維持していると考えるのが妥当である。

[0085] (4) 濃縮ウイルスサンプルのE L I S A解析

実施例5(2)で得た各濃縮ウイルスのウイルス粒子量を、H I V - 1粒

子の構造タンパク質 p24 を検出する p24 アンチジェン ELISA キット (Zeptomatrix 社製) により定量した。

[0086] (5) ウイルスの感染性

細胞培養用 6 ウェルプレートに 10% ウシ胎仔血清 (GIBCO 社製) を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; シグマ社製) 2 mL を添加し、さらに 5×10^4 個のヒト HT1080 細胞 (ATCC No. CCL-121) を添加し、24 時間培養した。次いで終濃度 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ のポリブレン添加培地 0.9 mL を用いて培地交換した。実施例 5 (2) で調製した濃縮ウイルス粒子を各ウェルに添加した。この際、ウイルス粒子の添加には、実施例 5 (4) で得た定量値に基づき、p24 タンパク質量で 100 ng、70 ng、もしくは 35 ng に相当するウイルス粒子量を使用した。7 時間の培養後、各ウェルに 1 mL の培地を添加し、さらに 24 時間培養した。2 mL の培地で培地交換後、さらに 2 日間培養した。培養後の細胞を PBS バッファーで洗浄した後、トリプシン処理により細胞を回収した。この細胞をフローサイトメーター解析に供した。

[0087] フローサイトメーター解析の結果から算出した AcGFP1 陽性率 (全細胞中の、ウイルスにより遺伝子が導入されて細胞内で AcGFP1 が発現している細胞の割合) と、濃縮ウイルスの由来やウイルス粒子添加量との関係を図 7 に示す。図 7 より、MazF 細胞から調製したウイルス粒子を感染させた細胞の AcGFP1 陽性率が Mock 細胞から調製したウイルス粒子を感染させた細胞と同程度であるのに対し、Gag-MazF 細胞から調製したウイルス粒子を感染させた細胞では、AcGFP1 陽性率が著しく低いことが分かった。

[0088] 以上の結果は、RNA ウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドと一本鎖 RNA 配列特異的エンドリボヌクレアーゼとが融合してなる融合タンパク質が、RNA ウイルスが感染した細胞においてウイルス粒子の出芽 (産生) を著しく抑制するだけでなく、出芽 (産生) したウイルス粒子内においても RNA ウイルスのウイルスゲノムを分解することによ

り、ウイルス粒子の感染性を顕著に低下（ウイルス粒子を顕著に不活化）させることを示す。

[0089] 実施例6 Gag-MazF及びNC-MazF発現細胞のウイルス感染阻害効果

(1) 融合タンパク質発現ベクター導入細胞の調製

細胞培養用6ウェルプレートに10%ウシ胎仔血清（GIBCO社製）を含有するダルベッコ改変イーグル培地（DMEM；シグマ社製）2mLを添加し、さらに 6×10^5 個のヒトLenti-X 293T/17細胞（クロンテック社製）を添加し、24時間培養した。次いで各ウェルの細胞に、2 μ gの実施例1（5）で構築したpBApo-MazF、実施例1（1）で構築したpBApo-Gag-MazF、又は実施例1（6）で構築したpBApo-NC-MazFを、TransIT-293（ミラス社製）を用いて当該製品の説明書の記載に従って導入した。5.5時間培養後、培地交換し18時間培養した。こうして調製した細胞を、それぞれ、MazF細胞、Gag-MazF細胞、及びNC-MazF細胞とした。

[0090] (2) レンチウイルスベクターの調製

コラーゲンコート処理した6cmディッシュに10%ウシ胎仔血清（GIBCO社製）を含有するダルベッコ改変イーグル培地（DMEM；シグマ社製）4mLを添加し、さらに 2.5×10^6 個のヒト293T/17細胞（ATCC CRL-11268）を添加し、24時間培養した。次いで各ディッシュの細胞にレンチウイルスパッケージングミックス（クロンテック社）、pLVX-AcGFP1-C1ベクター（クロンテック社）、pBApo-CMV pur DNAにHIV-1由来Tat遺伝子を挿入することにより構築されたpBApo-Tatを、TransIT-293（ミラス社製）を用いて当該製品の説明書の記載に従って導入した。各細胞を37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下で24時間培養後、培地交換を行ってさらに24時間培養した。培養終了後、培養上清を集めて0.45 μ mのフィルターでろ過した。得られたレンチウイルスベクター（AcGFP1）を、実施例6（3

) のウイルス感染実験に使用した。

[0091] (3) 融合タンパク質を発現する細胞を用いたレンチウイルス感染実験

実施例 6 (2) で調製したレンチウイルスベクターを、終濃度 $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにポリブレンを添加した培地で希釈した。実施例 6 (1) で調製した各細胞の懸濁液より培地を除去後、この希釈ウイルス 1 mL を添加した。24 時間後に培地交換し、さらに 24 時間培養した。各ウェルの細胞をトリプシン処理することにより回収し、PBS で細胞ペレットを洗浄した。

[0092] (4) 宿主染色体に挿入されたレンチベクターのプロウイルスコピー数の測定

実施例 6 (3) で調製した各細胞ペレットより常法に従って全 DNA を抽出した。この全 DNA を鋳型として、Cycleave PCR (登録商標)

Core Kit (タカラバイオ社製) を用いたリアルタイム PCR (qPCR) により、宿主細胞当たりのレンチウイルスベクター由来のプロウイルス DNA のコピー数を算出した。宿主細胞量は、Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR) (タカラバイオ社製) の hIFN γ Primer Mix for Provirus と hIFN γ Probe for Provirus をプライマー対、プローブとして用いた qPCR により求めた。また、プロウイルス DNA 量は、プライマー Lenti-copy 1-F (配列表の配列番号: 15)、プライマー Lenti-copy 1-R (配列表の配列番号: 16)、及びプローブ P1S (配列表の配列番号: 17) を用いた qPCR により求めた。宿主細胞当たりのプロウイルス DNA のコピー数は、上記の qPCR により求めた宿主細胞量とプロウイルス DNA 量より算出した。結果を図 8 に示す。

[0093] 図 8 より、Gag-Maz F 細胞及び NC-Maz F 細胞では、細胞当たりのプロウイルス DNA のコピー数が Maz F 細胞のそれと比較して著しく低いことが分かる。この結果から、本発明の融合タンパク質を細胞内で発現させることにより、RNA ウイルスの出芽を抑えるだけでなく、RNA ウィ

ルスが細胞に感染した際のプロウイルス形成も効果的に抑制可能であることが示された。プロウイルス形成の抑制は、レンチウイルスRNAと親和性のある本発明の融合タンパク質により、細胞に感染したRNAウイルスのウイルスゲノムRNAが逆転写反応前に切断されるためであると推察される。

産業上の利用可能性

[0094] 本発明は、特にRNAウイルス感染症の治療又は予防に有用である。

配列表フリーテキスト

[0095] SEQ ID NO:1 ; Insert DNA comprising a gene encoding a Gag_mazF fusion protein.

SEQ ID NO:2 ; Gag_MazF fusion protein.

SEQ ID NO:3 ; Oligonucleotide primer named mazF(HindIII)_R.

SEQ ID NO:4 ; Oligonucleotide primer named mazF(BamHI)_F.

SEQ ID NO:5 ; Gene encoding an ACA-less-mazF.

SEQ ID NO:7 ; Oligonucleotide primer named NC-FWD.

SEQ ID NO:8 ; Oligonucleotide primer named NC-Rev3.

SEQ ID NO:9 ; Oligonucleotide primer named human_18S_fw.

SEQ ID NO:10 ; Oligonucleotide primer named human_18S_rev.

SEQ ID NO:11 ; Oligonucleotide primer named ZsG_F2.

SEQ ID NO:12 ; Oligonucleotide primer named ZsG_R2.

SEQ ID NO:13 ; Oligonucleotide primer named beta_actin_fw.

SEQ ID NO:14 ; Oligonucleotide primer named beta_actin_rev.

SEQ ID NO:15 ; Oligonucleotide primer named Lenti-copy1-F.

SEQ ID NO:16 ; Oligonucleotide primer named Lenti-copy1-R.

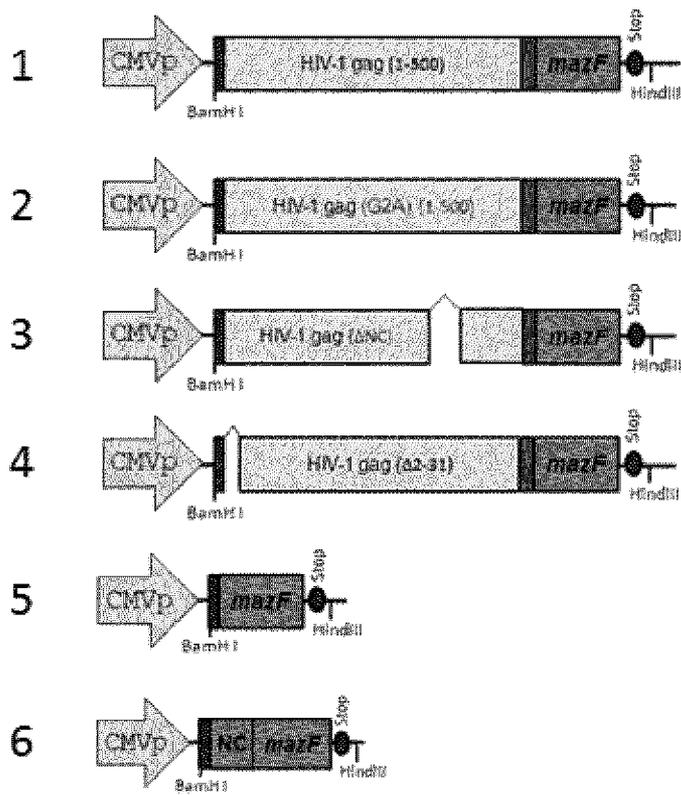
SEQ ID NO:17 ; Chimeric oligonucleotide probe named P1S.

請求の範囲

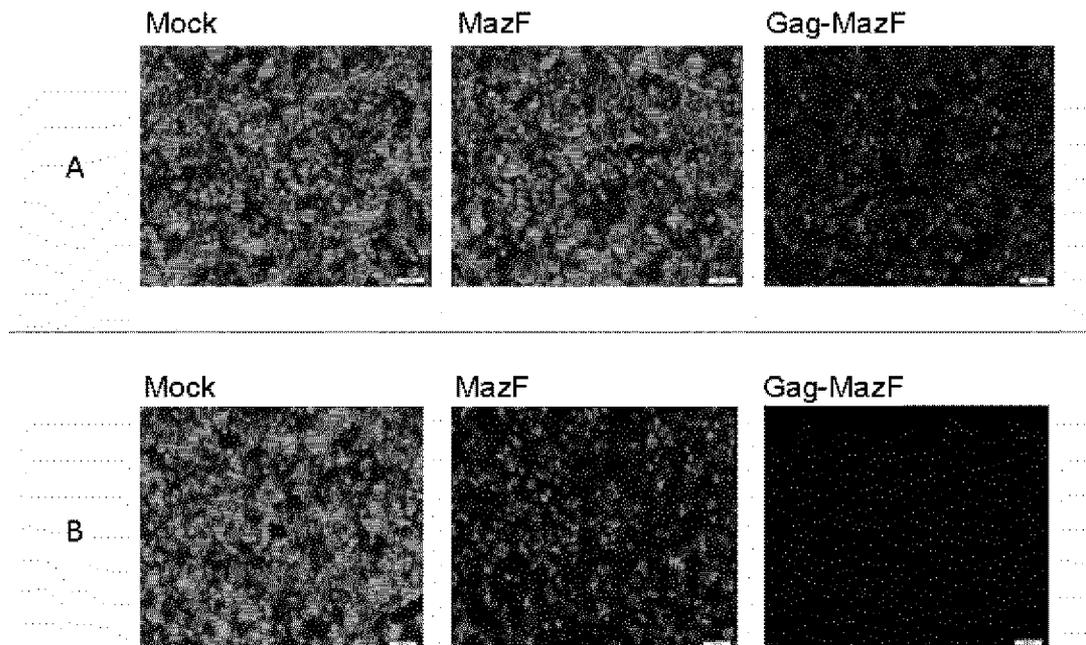
- [請求項1] RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドが一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼに融合されてなる、融合タンパク質。
- [請求項2] RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドがリンカーペプチドを介して一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼに融合されてなる、請求項1に記載の融合タンパク質。
- [請求項3] さらに、脂質修飾シグナルをN末端領域に有する、請求項1に記載の融合タンパク質。
- [請求項4] RNAウイルスのウイルスRNAに親和性を示すポリペプチドが、RNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドである、請求項1に記載の融合タンパク質。
- [請求項5] RNAウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドが、レトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドである、請求項4に記載の融合タンパク質。
- [請求項6] レトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドがレトロウイルスのGagタンパク質に由来する、請求項5に記載の融合タンパク質。
- [請求項7] レトロウイルスのGagタンパク質が、ヒト免疫不全ウイルスに由来するGagタンパク質である、請求項6に記載の融合タンパク質。
- [請求項8] Gagタンパク質に由来するレトロウイルスのパッケージングシグナルに親和性を示すポリペプチドがヌクレオカプシドである、請求項6に記載の融合タンパク質。
- [請求項9] 一本鎖RNAを配列特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼがMazFタンパク質である、請求項1に記載の融合タンパク質。
- [請求項10] 請求項1～9のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子を含む核酸。

- [請求項11] さらに、RNAウイルスのトランス作用因子により転写が誘導される転写調節配列を有し、ここで、前記の融合タンパク質をコードする遺伝子は前記の転写調節配列により発現の制御が可能な形態に配置されている、請求項10に記載の核酸。
- [請求項12] 転写調節配列が、Tatタンパク質および／またはRevタンパク質により転写が誘導される転写調節配列である、請求項11に記載の核酸。
- [請求項13] 請求項10に記載の核酸を含むベクター。
- [請求項14] レトロウイルスベクターである、請求項13に記載のベクター。
- [請求項15] 請求項13に記載のベクターを含む医薬組成物。
- [請求項16] 請求項10に記載の核酸が導入されてなる細胞。
- [請求項17] 請求項13に記載のベクターを細胞に接触する工程を含む、RNAウイルス感染症の治療又は予防方法。
- [請求項18] 請求項1に記載の融合タンパク質、請求項10に記載の核酸、及び請求項13に記載のベクターからなる群より選択された少なくとも1種を細胞に導入する工程を含む、RNAウイルスの出芽およびプロウイルス形成の抑制方法。

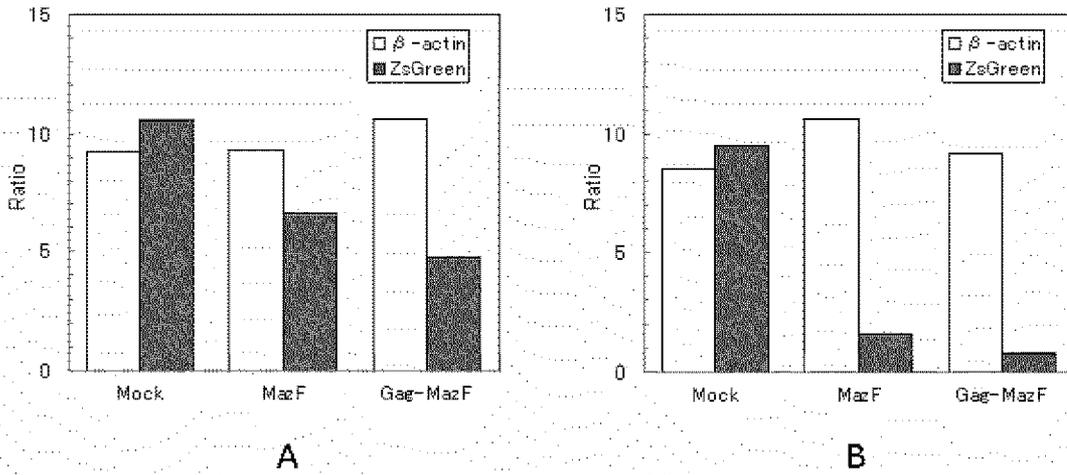
[図1]



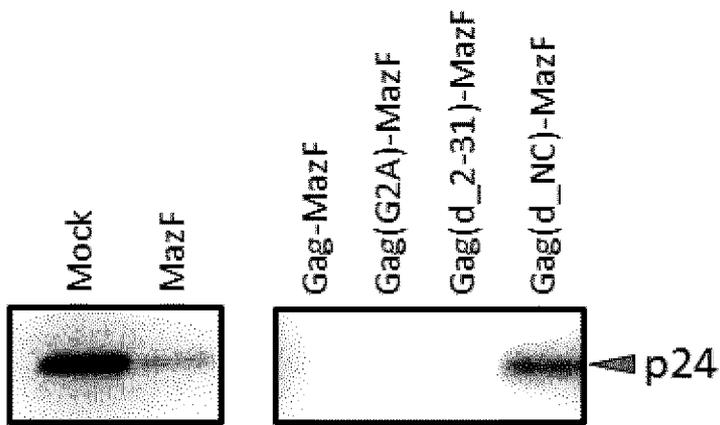
[図2]



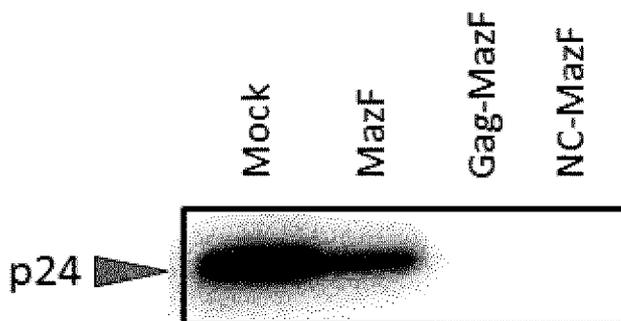
[図3]



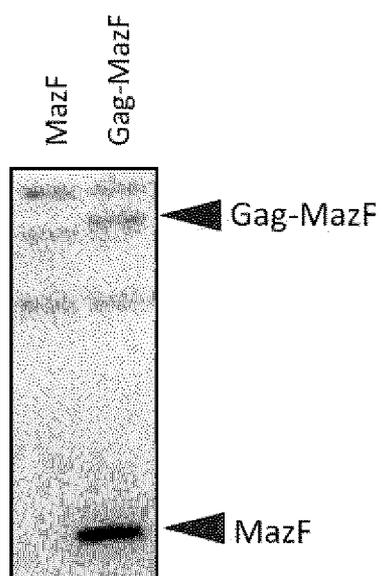
[図4]



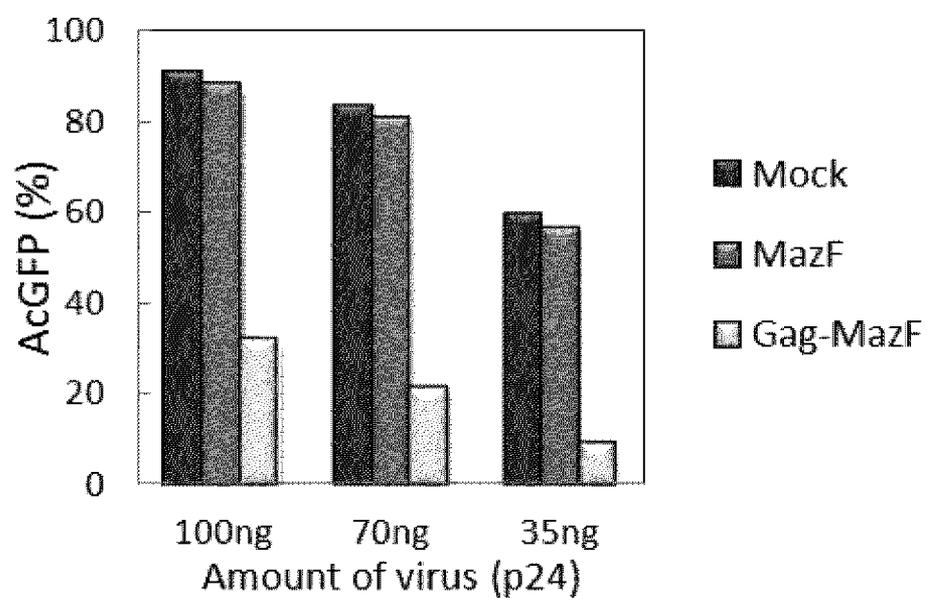
[図5]



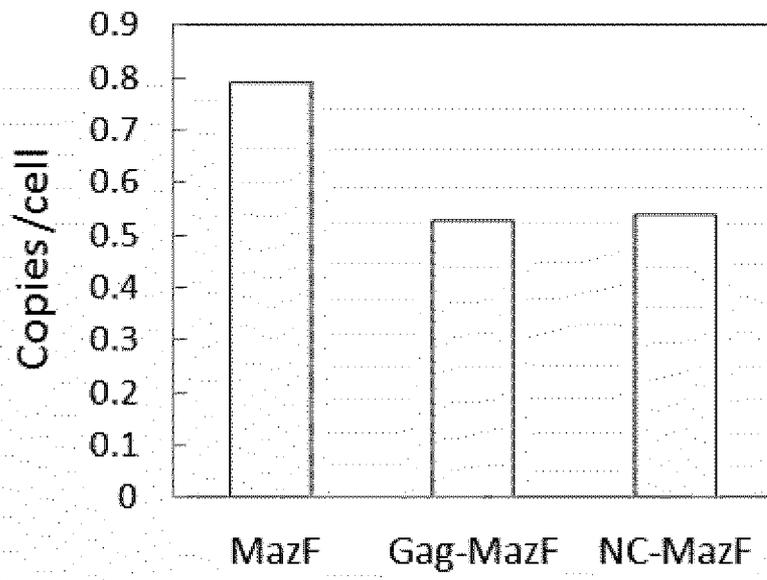
[Fig 6]



[Fig 7]



[圖8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N7/04(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, A61K48/00, A61P31/14, A61P31/18, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N7/04, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/020873 A1 (Takara Bio Inc.), 22 February 2007 (22.02.2007), entire text & EP 1921136 A1 & US 2010/113566 A1	1-16,18
Y	WO 2008/133137 A1 (Takara Bio Inc.), 06 November 2008 (06.11.2008), entire text & EP 2138580 A1 & US 2010/137415 A1	1-16,18
Y	WO 2009/051078 A1 (Takara Bio Inc.), 23 April 2009 (23.04.2009), entire text (Family: none)	1-16,18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 March, 2012 (23.03.12)Date of mailing of the international search report
03 April, 2012 (03.04.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054967

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OKAMOTO, M. et al., "RNA Bunkai Koso MazF ga HIV LTR Ryoiki no Shihaika de Hatsugen suru Retrovirus Vector Donyu Saibo ni Okeru HIV-1 Teikosei no Kakutoku", The Journal of AIDS Research, 2008, vol.10, no.4, P-090.	1-16,18
Y	SCHUMANN, G. et al., Therapeutic effect of a gag-nuclease fusion protein against retroviral infection in vivo, JOURNAL OF VIROLOGY, August 2001, Vol.75 No.15, pages 7030-7041.	1-16,18
Y	NATSOULIS, G. et al., Targeting of a nuclease to murine leukemia virus capsids inhibits viral multiplication, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, January 1995, Vol.92, pages 364-368.	1-16,18
Y	SCHUMANN, G. et al., Antiretroviral effect of a gag-RNase HI fusion gene, Gene Therapy, 1997, Vol.4, pages 593-599.	1-16,18
A	KOYANAGI, Y., "Outline of the HIV Replication and its Cellular Factors: the Track of an Invader in Cell", Virus, 2005, vol.55, no.2, pages 251 to 257	1-16,18
A	MURAKAMI, T. et al., Regulation of GAG trafficking and functions, The Journal of AIDS Research, 2007, Vol.9 No.2, pages 102-107.	1-16,18
A	SAKURAGI, J., "Structure and Function of HIV Virion Hosu Shutsuga kara Kyuchaku Shinnyu made", Virus, 2002, vol.52, no.1, pages 95 to 102	1-16,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054967

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01) i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054967

Box No. II 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. Claims Nos.: 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 17 involves a method for treatment of human being by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search.

- 2. Claims Nos.:
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:

- 3. 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 No. III 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. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. 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. 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**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N7/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/00, A61K48/00, A61P31/14, A61P31/18, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N7/04, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

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

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)、PubMed、CiNii、WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2007/020873 A1 (タカラバイオ株式会社) 2007.02.22, 全文 & EP 1921136 A1 & US 2010/113566 A1	1-16, 18
Y	WO 2008/133137 A1 (タカラバイオ株式会社) 2008.11.06, 全文 & EP 2138580 A1 & US 2010/137415 A1	1-16, 18

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

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

国際調査を完了した日

23.03.2012

国際調査報告の発送日

03.04.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

白井 美香保

4 N

4502

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2009/051078 A1 (タカラバイオ株式会社) 2009. 04. 23, 全文 (ファミリーなし)	1-16, 18
Y	OKAMOTO, M. et al., RNA分解酵素・Maz FがHIV LTR 領域の支配下で発現するレトロウイルスベクター導入細胞における HIV-1抵抗性の獲得, The Journal of AIDS Research, 2008, Vol.10 No.4, P-090.	1-16, 18
Y	SCHUMANN, G. et al., Therapeutic effect of a gag-nuclease fusion protein against retroviral infection in vivo, JOURNAL OF VIROLOGY, August 2001, Vol.75 No.15, pages 7030-7041.	1-16, 18
Y	NATSOUKIS, G. et al., Targeting of a nuclease to murine leukemia virus capsids inhibits viral multiplication, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, January 1995, Vol.92, pages 364-368.	1-16, 18
Y	SCHUMANN, G. et al., Antiretroviral effect of a gag-RNase HI fusion gene, Gene Therapy, 1997, Vol.4, pages 593-599.	1-16, 18
A	KOYANAGI, Y., HIV感染増殖とその宿主細胞性因子の概略: 細胞 への侵入者の軌跡, ウイルス, 2005, Vol.55 No.2, pages 251-257.	1-16, 18
A	MURAKAMI, T. et al., Regulation of GAG trafficking and functions, The Journal of AIDS Research, 2007, Vol.9 No.2, pages 102-107.	1-16, 18
A	SAKURAGI, J., 粒子としてのHIVの成り立ちとふるまい 包装・ 出芽から吸着・侵入まで, ウイルス, 2002, Vol.52 No.1, pages 95-102.	1-16, 18

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 提出手段
- 紙形式
- 電子形式
- b. 提出時期
- 出願時の国際出願に含まれていたもの
- この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 17 は、人間を対象として治療する方法を含んでおり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。