(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4180650号
(P4180650)
(45)発行日　平成20年11月12日(2008.11.12)　(24)登録日　平成20年9月5日(2008.9.5)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 ZNAA
C12Q 1/70 (2006.01)　C12Q 1/70

請求項の数 14　(全 52 頁)

(21)出願番号　特願平5-517595
(86)(22)出願日　平成5年3月29日(1993.3.29)
(65)公表番号　特表平7-509121
(43)公表日　平成7年10月12日(1995.10.12)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/002908
(87)国際公開番号　WO1993/020212
(87)国際公開日　平成5年10月14日(1993.10.14)
審査請求日　平成10年10月16日(1998.10.16)
審判番号　不服2001-18012(P2001-18012/J1)
審判請求日　平成13年10月9日(2001.10.9)
(31)優先権主張番号　858,747
(32)優先日　平成4年3月27日(1992.3.27)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　502006782
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国　メリーランド州　２０８５２，ロックヴィル，エグゼキュティブ・ブールバード　６０１１，スイート　３２５，ナショナル　インスティチューツ・オブ・ヘルス，オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100071124
弁理士　今井　庄亮
(74)代理人　100076691
弁理士　増井　忠弐

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ｍＲＮＡの阻害／不安定領域の除去方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a)変異HIV-1 gag遺伝子を含む核酸構築物であって、変異HIV-1 gag遺伝子のコード配列が天然のHIV-1 gag遺伝子の対応する核酸配列中に存在する阻害／不安定配列の効果を減少させる、阻害／不安定配列へ変異を導入する多重点突然変異を含む前記核酸構築物で形質導入した宿主細胞を提供し、
(b)上述のポリペプチドの発現を起こすように上述の宿主細胞を培養し；そして
(c)上述のポリペプチドを回収する；
工程を含む、本来の生産が実験的に同定された阻害／不安定配列の存在により妨げられている、HIV-1 gagポリペプチドを生産する方法。
【請求項２】
核酸構築物が、HIV-1分子クローンpHXB2のヌクレオチド配列のヌクレオチド402および452の間、536および583の間、585および634の間、そして654および703の間に対応するヌクレオチド間に多重点突然変異を含む、請求項1の方法。
【請求項３】
核酸構築物が、以下のヌクレオチド配列：
ヌクレオチド402～452でのccaggggaa agaagaagta caagctaaag cacatcgtat gggcaagcagg（SEQ ID NO: 6）；および
ヌクレオチド536～583でのccttcagaca ggatcagagg agcttcgatc actatacaac acagtagc（SEQ ID NO: 7）；

を含む、請求項2の方法。
【請求項４】
核酸構築物が、以下のヌクレオチド配列：ヌクレオチド585～634でのaccctctatt gtgtgca cca gcggatcgag atcaaggaca ccaaggaagc（SEQ ID NO: 8）
を含む、請求項2の方法。
【請求項５】
核酸構築物が、以下のヌクレオチド配列：ヌクレオチド654～703でのgagcaaaaca agtccaa gaa gaaggcccag caggcagcag ctgacacagg（SEQ ID NO: 9）を含む、請求項2の方法。
【請求項６】
核酸構築物が、HIV-1分子クローンpHXB2のヌクレオチド配列のヌクレオチド871および915の間、1105および1139の間、1140および1175の間、そして1321および1364の間に対応するヌクレオチド間に多重点突然変異を含む、請求項2～5のいずれかの方法。
【請求項７】
核酸構築物が、以下のヌクレオチド配列：ヌクレオチド871～915でのccaccccaca ggacctg aac acgatgttga acaccgtggg gggac（SEQ ID NO: 25）を含む、請求項6の方法。
【請求項８】
核酸構築物が、以下のヌクレオチド配列：ヌクレオチド1105～1139でのcagtaggaga gatct acaag aggtggataa tcctg（SEQ ID NO: 27）を含む、請求項6の方法。
【請求項９】
核酸構築物が、以下のヌクレオチド配列：ヌクレオチド1140～1175でのggattgaaca agatc gtgag gatgtatagc cctacc（SEQ ID NO: 29）を含む、請求項6の方法。
【請求項１０】
核酸構築物が、以下のヌクレオチド配列：ヌクレオチド1321～1364でのattgtaagac catcc tgaag gctctcggcc cagcggctac acta（SEQ ID NO: 33）を含む、請求項6の方法。
【請求項１１】
上述の宿主細胞が原核生物である、請求項1の方法。
【請求項１２】
上述の宿主細胞が真核生物である、請求項1の方法。
【請求項１３】
上述の遺伝子がcDNAである、請求項1～12のいずれかの方法。
【請求項１４】
上述の遺伝子がゲノムである、請求項1～12のいずれかの方法。
【発明の詳細な説明】
本出願は１９９２年3月２７日に提出された米国シリアルナンバー０７／８５８、７４７の一部継続出願である。
Ｉ．技術分野
本発明は転写を阻害あるいは減衰させる遺伝子のコード領域中の調節あるいは阻害／不安定配列（ＩＮＳ）に突然変異を導入した遺伝子により生産されるｍＲＮＡの安定性および／あるいは有用性の増加方法に関連する。本発明はまた本方法に従って突然変異を導入した遺伝子を保持する発現ベクターを含む構築物および当該構築物を含む宿主細胞に関連する。
本発明の方法はタンパク質をコードする能力を変化させずにｍＲＮＡの安定性および／あるいは有用性の増加に特に有効である。本方法は本来ｍＲＮＡ転写物中のＩＮＳ領域の存在のために発現されないあるいは発現されても僅かである遺伝子の発現を許容あるいは増加するのに有用である。このように本発明の方法、構築物および宿主細胞は、ＩＮＳを含むｍＲＮＡ転写物をコードするいかなる遺伝子によって生産されるタンパク質量の増加に有用である。
本発明の方法、構築物および宿主細胞は、たとえば増殖因子、インターフェロン、インターロイキン、ｆｏｓ原癌遺伝子タンパク質、およびＨＩＶ－１　ｇａｇおよびｅｎｖをコードする遺伝子から生産されるタンパク質量の増加に有用である。

本発明はまた、例えばワクチンのような免疫療法および免疫的予防措置、あるいは人体中で発現後の遺伝子療法における本発明の構築物の使用に関連する。このような構築物はレトロウイルスあるいは他の発現ベクターを含んだり融合され、あるいはまた構築物は組織細胞に直接注入されてコードされたタンパク質あるいはタンパク質断片を効率的に発現することもできる。これらの構築物はまた、たとえばｉｎ　ｓｉｔｕの標的遺伝子との相同的組換によるｉｎ－ｖｉｖｏあるいはｉｎ－ｖｉｔｒｏの遺伝子置換に使用できる。

本発明はまたいかなるｍＲＮＡ中の阻害／不安定配列の境界を簡単にすぐに検出および／あるいは限定するために使用できる例示した構築物、これらの構築物を使用する方法、およびこれらの構築物を含む宿主細胞に関連する。一度ｍＲＮＡのＩＮＳ領域が位置付けされおよび／あるいはさらに定義されると、これらのＩＮＳ領域をコードするヌクレオチド配列に、ｍＲＮＡの安定性および／あるいは有用性を増加させうる本発明の方法に従って突然変異を導入し、それゆえ、突然変異の導入されたｍＲＮＡをコードする発現ベクターより生産されるタンパク質量が増加することになる。

ＩＩ．背景技術

転写制御機構の研究に多くの仕事が為されてきて、転写後修飾もまた、与えられた遺伝子により生産されたＲＮＡの量及び有用性を変化させるということが次第に明らかになってきた。これらの転写後修飾は細胞質内のＲＮＡ分解に加えて核における転写後修飾（例えばスプライシング、ポリアデニル化、および輸送）を含む。これらの修飾はすべて特定の転写物の最終定常状態レベルに貢献する。これらの制御点は１つの過程が単独で生産するよりもより柔軟な制御体系を生み出す。例えば多量に転写されて効率よく修飾されても短命のメッセンジャーは安定したものよりも量が少ない。効率的な合成速度はメッセンジャーが細胞質に到達し翻訳されることを保証するが、急速な分解速度はｍＲＮＡが高レベルに蓄積しないことを保証する。例えば原癌遺伝子であるｃ－ｍｙｃおよびｃ－ｆｏｓのｍＲＮＡのような多くのＲＮＡは、非常に低レベルで発現され、急速に衰退し、種々の条件下ですばやくそして一時的に修飾される点でこの種の制御を示すという研究がなされた。レビューとしてＭ．Ｈｅｎｔｚｅ，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　１０９０：２８１－２９２（１９９１）を参照。これらのｍＲＮＡの多くの分解速度はｍＲＮＡそのものの中にある１つあるいはそれ以上の不安定／抑制配列の存在に相関することが示された。

不安定あるいは短命のｍＲＮＡをコードする細胞内遺伝子の中には転写されたｍＲＮＡの３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）内にＡおよびＵが豊富な（ＡＵ－リッチ）ＩＮＳを含むものがあると示された。これらの細胞内遺伝子は、ＡＵ－リッチ３’ＵＴＲ配列（ＡＵＵＵＡ配列モチーフを８コピー含む）がマウスとヒトのあいだでタンパク質をコードする配列そのものよりもより高度に保存されている（６５％にたいして９３％）顆粒細胞－単細胞コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）（Ｇ．Ｓｈａｗ，およびＲ．Ｋａｍｅｎ，Ｃｅｌｌ　４６：６５９－６６７（１９８６））および進化を通じて非翻訳領域が保存されているｍｙｃ原癌遺伝子（ｃ－ｍｙｃ）（例えばヒトとマウスで８１％）（Ｍ．ＣｏｌｅおよびＳ．Ｅ．Ｍｏｎｇｏ、Ｅｎｚｙｍｅ　４４：１６７－１８０（１９９０））を含む。３’ＵＴＲ内にＡＵ－リッチ配列を含むことが示された他の不安定なあるいは短命なｍＲＮＡはインターフェロン（アルファ、ベータ、およびガンマＩＦＮ）；インターロイキン（ＩＬ１，ＩＬ２およびＩＬ３）；癌ネクローシス因子（ＴＮＦ）；リンフォトキシン（Ｌｙｍ）；ＩｇＧ１誘導因子（ＩｇＧ　ＩＦ）；顆粒細胞コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、ｍｙｂ原癌遺伝子（ｃ－ｍｙｂ）およびｓｉｓ原癌遺伝子（ｃ－ｓｉｓ）（Ｇ．Ｓｈａｗ，およびＲ．Ｋａｍｅｎ，Ｃｅｌｌ　４６：６５９－６６７（１９８６））を含む。Ｒ．ＷｉｓｄｏｍおよびＷ．Ｌｅｅ，Ｇｅｎ．＆Ｄｅｖｅｌ．５：２３２－２４３（１９９１）（ｃ－ｍｙｃ）；Ａ．Ｓｈｙｕら．，Ｇｅｎ．＆Ｄｅｖｅｌ．５：２２１－２３１（１９９１）（ｃ－ｆｏｓ）；Ｔ．ＷｉｌｓｏｎおよびＲ．Ｔｒｅｉｓｍａｎ，Ｎａｔｕｒｅ　３３６：３９６－３９９（１９８８）（ｃ－ｆｏｓ）；Ｔ．ＪｏｎｅｓおよびＭ．Ｃｏｌｅ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．７：４５１３－４５２１（１９８７）（ｃ－ｍｙｃ）；Ｖ．Ｋｒｕｙｓら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８９：６７３

－６７７（１９９２）（ＴＮＦ）；Ｄ．Ｋｏｅｌｌｅｒら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．８８：７７７８－７７８２（１９９１）（トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）およびｃ－ｆｏｓ）；Ｉ．Ｌａｉｒｄ－Ｏｆｆｒｉｎｇａら．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：２３８７－２３９４（１９９１）（ｃ－ｍｙｃ）；Ｄ．ＷｒｅｓｃｈｎｅｒおよびＧ．Ｒｅｃｈａｖｉ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１７２：３３３－３４０（１９８８）（遺伝子の探索および比較安定性の概論を含む）；Ｂｕｎｎｅｌｌら．，Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．１６：１５１－１６２（１９９０）（ガラクトシルトランスフェラーゼ関連タンパク質（ＧＴＡ）、ヒト、マウスおよびラット間で９８％の相同性のあるＡＵ－リッチ３’ＵＴＲ領域を含む）；およびＣａｐｕｔらＰｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８３：１６７０－１６７４（１９８６）（ＴＮＦ，ネズミおよびヒトのＴＮＦ ｍＲＮＡ中に全体として保存された３３ヌクレオチドのＡＵ－リッチ配列を含む）もまた参照。

ｍＲＮＡの３’ＵＴＲ内にＩＮＳを含むと示されたこれらの細胞内遺伝子のうちいくつかはコード領域内にもＩＮＳを含むことが示されている。例えばＲ．Ｗｉｓｄｏｍ，およびＷ．Ｌｅｅ，Ｇｅｎ．＆Ｄｅｖｅｌ．５：２３２－２４３（１９９１）（ｃ－ｍｙｃ）；Ａ．Ｓｈｙｕら．，Ｇｅｎ．＆Ｄｅｖｅｌ．５：２２１－２３１（１９９１）（ｃ－ｆｏｓ）参照。

細胞内ｍＲＮＡと同様に、いくつかのＨＩＶ－１ ｍＲＮＡは、タンパク質コード領域内にＩＮＳを含むことが示されていて、それはある例において高ＡＵ－含量部分と一致する。例えばＨＩＶ－１ ｇａｇをコードする配列中においてｇａｇ遺伝子の５’末端に存在する高ＡＵ含量（６１．５％）２１８ヌクレオチド領域はｇａｇ発現の抑制と関連がある。Ｓ．Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１５０－１５９（１９９２）。さらなる実験によりウイルスゲノムのｇａｇタンパク質分解酵素遺伝子領域中に１つ以上のＩＮＳが存在することが示された（下記参照）。高ＡＵ含量の領域はＨＩＶ－１ ｇａｇ／ｐｏｌおよびｅｎｖのＩＮＳ領域中に見いだされた。ＡＵＵＵＡ配列はｇａｇコード配列中には存在しないが、ｇａｇ／ｐｏｌおよびｅｎｖコード領域中には多コピー存在する。Ｓ．Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１５０－１５９（１９９２）。例えばＭ．Ｅｍｅｒｍａｎ，Ｃｅｌｌ ５７：１１５５－１１６５（１９８９）（ｅｎｖ遺伝子は３’ＵＴＲおよび内部阻害／不安定配列の両方を含む）；Ｃ．Ｒｏｓｅｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ ８５：２０７１－２０７５（１９８８）（ｅｎｖ）；Ｍ．Ｈａｄｚｏｐｏｕｌｏｕ－Ｃｌａｄａｒａｓら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：１２６５－１２７４（１９８９）（ｅｎｖ）；Ｆ．Ｍａｌｄａｒｅｌｌｉら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：５７３２－５７４３（１９９１）（ｇａｇ／ｐｏｌ）；Ａ．Ｃｏｃｈｒａｎｅら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：５３０３－５３１３（１９９１）（ｐｏｌ）もまた参照。Ｆ．Ｍａｌｄａｒｅｌｌｉら．，（上述）は複製成分に関してＩＮＳ領域の機能を直接分析し、ＨＩＶ－１プロウイルスの全長は遺伝子内ＩＮＳがウイルス構造タンパク質のコード配列中に位置するという事実により複雑であると言及している。彼らはさらにこれらの遺伝子内ＩＮＳ配列中の変異は多くの場合たんぱく質配列にも影響を与え、このような突然変異体の複製にも影響を与えると言及している。

ＩＮＳ領域はＡＵーリッチである必要はない。例えばｃ－ｆｏｓのコード領域のＩＮＳは構造的にＡＵーリッチの３’ＵＴＲ ＩＮＳとは関連がないし（Ａ．Ｓｈｙｕら．，Ｇｅｎ．＆Ｄｅｖｅｌ．５：２２１－２３１（１９９１）、ＩＮＳ要素を含むと見られるｅｎｖコード領域のある部分はＡＵ－リッチではない。さらに、安定な転写物の中にもその３’ＵＴＲ中にＡＵＵＵＡモチーフを持つものがあり、この配列のみでは転写物を不安定にするのに十分である訳ではなく、あるいはこれらのメッセンジャーが優性の安定化要素も含む（Ｍ．ＣｏｌｅおよびＳ．Ｅ．Ｍａｎｇｏ，Ｅｎｚｙｍｅ ４４：１６７－１８０（１９９０））ということを示している。興味深いことに特定のｍＲＮＡに独特の要素がまたｍＲＮＡ転写物を安定化できるとして見いだされている。１つの例はＲｅｖタンパク質存在中にてｍＲＮＡ転写物の輸送、安定性および有用性を促進するＲｅｖ反応要素である（Ｂ．Ｆｅｌｂｅｒら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１４

９５－１４９９（１９８９））。
ＡＵ配列そのもの、および特にＳｈａｗ－Ｋａｍｅｎ配列 ＡＵＵＡが分解シグナルの一部あるいはすべてとして働くかどうかまだ知られていない。これが短命のメッセンジャーに関わる唯一の機構であるかどうか、あるいはＲＮＡにはさまざまな階層があって各々独自の分解体系を持つのかどうか明かではない。レビューとしてＭ．ＣｏｌｅおよびＳ．Ｅ．Ｍｏｎｇｏ，Ｅｎｚｙｍｅ ４４：１６７－１８０（１９９０）参照；Ｔ．ＪｏｎｅｓおよびＭ．Ｃｏｌｅ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．７：４５１３－４５２１（１９８７）もまた参照。ｃ－ｍｙｃ ＲＮＡ ＩＮＳ領域中の唯一のＡＵＵＵＡ配列に突然変異を導入してもＲＮＡの半減期に影響はなく、それゆえ、抑制配列はＧＭ－ＣＳＦのそれとはまったく異なるのかも知れない（Ｍ．ＣｏｌｅおよびＳ．Ｅ．Ｍａｎｇｏ，Ｅｎｚｙｍｅ ４４：１６７－１８０（１９９０））、あるいはｍＲＮＡの不安定性はｍＲＮＡ中のさらなるＩＮＳ領域の存在によるためかも知れない。
上述の研究者たちは転写されたｍＲＮＡの３’ＵＴＲ中のＡＵ－リッチ阻害／不安定配列をコードする遺伝子の中に突然変異を導入した。例えばＧ．ＳｈａｗおよびＲ．Ｋａｍｅｎ，Ｃｅｌｌ ４６：６５９－６６７（１９８６）はウサギβ－グロビン遺伝子の３’ＵＴＲの中にＧＭ－ＣＳＦ由来の５１ヌクレオチドのＡＴ－リッチ配列を導入した。この挿入によって本来安定なβ－グロビンｍＲＮＡがｉｎ ｖｉｖｏで高度に不安定になり、野生型の対照と比較してβ－グロビンの発現は劇的に減少する結果となった。配列中に１４個のＧおよびＣを点在させた同じ長さの別の配列をウサギβ－グロビン遺伝子の３’ＵＴＲの同じ場所に導入したところ野生型βグロビンｍＲＮＡと同程度の蓄積が生じた。この対照配列はＡＵ－リッチ配列に７回現れるＡＵＵＵＡモチーフを含まなかった。この結果はβ－グロビンｍＲＮＡ中のＡＵ－リッチ配列の存在が特に不安定性に関与していることを示唆している。
Ａ．Ｓｈｙｕら．，Ｇｅｎ．＆Ｄｅｖｅｌ．５：２２１－２３１（１９９１）はＵからＡへ単一の点突然変異を導入することによってその配列を変化させるが要素のＡＵの豊富さは保持することにより、３つすべてのＡＵＵＵＡペンタヌクレオチドを破壊してｃ－ｆｏｓの３’ＵＴＲ中のＡＵ－リッチＩＮＳを研究した。３’ＵＴＲ ＩＮＳ配列中のこの変化は、野生型のＩＮＳと比較してβグロビンｍＲＮＡの３’ＵＴＲに挿入したとき突然変異を導入した３’ＵＴＲがβグロビンメッセンジャーを不安定化する能力を劇的に抑制した。ｃ－ｆｏｓタンパク質をコードする領域のＩＮＳ（３’ＵＴＲ ＩＮＳとは構造的に関連がない）は、βグロビンのコード領域に読み枠を合わせて挿入し、ヘテロなｃ－ｆｏｓ－βグロビンｍＲＮＡの安定性の欠如の効果を観察することによって研究された。
上述の研究者たちはまた、阻害／不安定配列をコードしている遺伝子の転写されたｍＲＮＡのコード領域の中に突然変異を導入した。例えばＰ．Ｃａｒｔｅｒ－ＭｕｅｎｃｈａｕおよびＲ．Ｗｏｌｆ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８６：１１３８－１１４２（１９８９）はＥ．ｃｏｌｉ ６－フォスフォグルコネートデヒドロゲナーゼ（ｇｎｄ）遺伝子のコード配列中にある負の制御領域の存在を実証した。この要素の境界は合成した”内部相補配列”（ＩＣＳ）をクローニングして、ｇｎｄ遺伝子内部のいくつかの場所に位置させるとこの内部相補要素の遺伝子発現への影響が観察されることによって決定された。ｇｎｄ－ｌａｃＺ融合遺伝子の発現の制御に対する、部位特異的突然変異の導入によって合成ＩＣＳ要素中に導入した１つおよび２つの突然変異の効果は、リボソーム結合部位を隠すように各々のｍＲＮＡが２次構造を形成する能力と関連があった。このように、ｇｎｄ遺伝子の内部制御要素はシスに働くアンチセンスＲＮＡとして機能すると見られる。
Ｍ．Ｌｕｎｄｉｇｒａｎら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１４７９－１４８３（１９９１）は、－６０から＋２５３（コード領域は＋２４１から始まる）の領域に突然変異を導入し、それから読み枠を合わせてｌａｃＺに融合することにより、ｂｔｕＢの適切な発現および転写制御に重要な関連した配列を同定するための実験を行った。それから単一の塩基置換を含む変異プラスミドからのβガラクトシダーゼ発現を分析した。突然変異は使用した突然変異導入方法によるとすべてＧＣからＡＴへの変換

であった。さまざまな突然変異の中で、＋２５３位の単一塩基置換により抑制及び非抑制条件下で共にｂｔｕＢ－ｌａｃＺ融合遺伝子の発現が非常に増加した。
Ｒ．ＷｉｓｄｏｍおよびＷ．Ｌｅｅ，Ｇｅｎ．＆Ｄｅｖｅｌ．５：２３２－２４３（１９９１）は翻訳開始コドンがＡＴＧからＡＴＣに変異した全長のハイブリッドｃ－ｍｙｃ遺伝子由来のｍＲＮＡは比較的安定であることを示す実験を行い、ｃ－ｍｙｃコード領域の抑制配列は翻訳に依存した形で機能することが示唆された。
Ｒ．ＰａｒｋｅｒおよびＡ．Ｊａｃｏｂｓｏｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：２７８０－２７８４（１９９０）はＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ Ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ＭＡＴα１ ｍＲＮＡのコード領域中に見いだされた通常は低い安定性にかかわる４２ヌクレオチドの領域は、この４２ヌクレオチド断片のすぐ上流に翻訳の停止コドンを導入することによって実験的に不活性化し得ることが実証された。この実験によりＭＡＴα１ ｍＲＮＡの分解はコード配列の特定の領域によるリボソームの転位（トランスロケーション）によって促進されることが示唆された。この４２ヌクレオチド断片は翻訳の伸長を遅らせると思われる希なコドン（希なコドンは１０００酵母コドンにつき１３回以下しか現れないものとして定義される（Ｓ．Ａｏｔａら．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１６：ｒ３１５－ｒ４０２（１９８８））を高含量（１４中８）持つ。この研究の著者であるＲ．ＰａｒｋｅｒおよびＡ．Ｊａｃｏｂｓｏｎは、不安定な酵母ｍＲＮＡ中にある稀なコドンの分布および翻訳の一時停止を誘導する稀なコドンの既知の能力が共役した急速な衰退に必要な配列中の希なコドンの量は、ｍＲＮＡの構造変化は一時停止したリボソームの特定の位置によって影響されるというモデルを示唆すると提唱する。他の著者は翻訳伸長における速度論的変化がｍＲＮＡの安定性に影響し得るかどうか（およびどのように）を見いだすことは重要であると述べた（Ｍ．Ｈｅｎｔｚｅ，Ｂｉｏｃｈ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ １０９０：２８１－２９２（１９９１））。しかし、Ｒ．ＰａｒｋｅｒおよびＡ．Ｊａｃｏｂｓｏｎは安定なＰＧＫ１ ｍＲＮＡを稀なコドンが最高４０％まで増加するよう変化させて、少なくとも定常状態のｍＲＮＡレベルの３倍の効果を与えることができること、およびこの相違は実際には転写速度の変化によるだろうと述べている。このようにこれらの著者はリボソーム一時停止そのものは急速なｍＲＮＡ衰退を促進するのに十分ではないと見られると結論した。
上述の文献はいずれも、ｍＲＮＡのコード領域内に阻害／不安定配列の位置を見つけ、そのｍＲＮＡをコードしている遺伝子を修飾して、遺伝子のコード能力を変化させずに様々なヌクレオチド置換を作成することによってこれらの阻害／不安定性配列を除去するという本発明について記述していないし、示唆していない。

ＩＩＩ．発明の開示

本発明は、遺伝子コード領域中に存在して該遺伝子の発現を邪魔する若しくは減らす調節もしくは阻害／不安定配列（ＩＮＳ）を変異させることによって、遺伝子により生産されるｍＲＮＡの安定性および／もしくは有用性を増大させる方法に関する。本発明はまた、発現ベクターを含めた、これらの方法に従い変異させられた遺伝子を含むコンストラクト（構築物）、およびこれらのコンストラクトを含む宿主細胞にも関する。
本明細書中での定義として、転写産物の阻害／不安定配列は、ｍＲＮＡ転写産物内にある調節配列であり、（１）そのｍＲＮＡの迅速なターンオーバーを担い、第２のインジケーター／レポーターｍＲＮＡに融合させた場合に、そのインジケーター／レポーターｍＲＮＡを不安定化させうる、または（２）ｍＲＮＡの利用を不十分にさせ、第２のインジケーター／レポーターｍＲＮＡに融合させた場合に、そのインジケーター／レポーターｍＲＮＡからの蛋白質生産の減少をもたらしうる、あるいは（３）上述の両方をもたらすものである。遺伝子の阻害／不安定配列は、転写産物の阻害／不安定配列をコードする遺伝子配列である。本明細書中で使われるように、利用（性）（utilization）とは、ｍＲＮＡの翻訳の全体的な効率に関する。
本発明の方法は、ｍＲＮＡの蛋白質コード能を変えることなく、ｍＲＮＡの安定性および／もしくは利用性を増大させることに特に有用である。しかし、コードされる蛋白質のアミノ酸配列が保存的もしくは非保存的アミノ酸置換を含むように変えられるようなやり方

で、阻害／不安定配列が変異される（但し、それでも尚、本来コードされていた蛋白質の機能を保持している）本発明の別の態様も本発明の一部である。
これらの方法は、ｍＲＮＡ転写産物のＩＮＳ領域の存在のために、本方法がなければ発現しない、もしくは僅かしか発現しない遺伝子の発現を可能にする、もしくは増加させるのに有用である。本発明は、阻害／不安定領域をコードする遺伝子いずれかのヌクレオチド配列部分を変更することによって、阻害／不安定領域を含むｍＲＮＡをコードする遺伝子によりコードされる蛋白質の生産を増加させる方法を提供する。
本発明の方法、コンストラクトおよび宿主細胞は、ＩＮＳを含むｍＲＮＡ転写産物をコードするいかなる遺伝子により産生される蛋白質の量を増加させるのにも有用である。そのような遺伝子の例には、例えば、ＨＩＶ－１　ｇａｇおよびｅｎｖ蛋白質をコードする遺伝子の他に、増殖因子、インターフェロン、インターロイキン、およびｆｏｓ原癌遺伝子蛋白質をコードする遺伝子が含まれる。
本発明の方法は、ＨＩＶ－１　ｇａｇ遺伝子のコード領域内のＩＮＳを変異導入により不活化して、ｇａｇの発現を増加させることにより、並びにヒト細胞においてＲｅｖ非依存性ｇａｇ発現に有用なコンストラクトにより例示される。この阻害／不安定配列の変異不活化は、ｇａｇ遺伝子のコード領域内のＡＵに富んだ阻害配列への多重点変異導入（但し、ヌクレオチドコード配列の縮重により、ｇａｇ蛋白質のアミノ酸配列には影響しない変異）を用いる。
本発明のコンストラクトは、本発明の方法に従い変異導入されたｇａｇ　ｅｎｖおよびｐｏｌ遺伝子を含むベクターにより例示され、宿主細胞はこれらのベクターを含むヒトＨＬｔａｔ細胞により例示される。
本発明はまた、本発明のコンストラクトを、例えばワクチンとして、免疫療法および免疫予防に、またはヒトにおいて発現させた後の遺伝子治療に利用することにも関する。そのようなコンストラクトは、レトロウイルスベクター若しくは他の発現ベクターを含んだり、若しくはそうしたベクターに取り込まれてもよく、または、それらは、コードされる蛋白質もしくは蛋白質断片が効率よく発現するように、組織細胞に直接注入してもよい。これらのコンストラクトは、例えば、標的遺伝子とｉｎ－ｓｉｔｕに相同性組み換えさせることにより、ｉｎ－ｖｉｖｏもしくはｉｎ－ｖｉｔｒｏ遺伝子置換に用いることもできる。
本発明はまた、阻害／不安定領域を含むと知られている、若しくはそう思われるいかなるｍＲＮＡにおいても、阻害／不安定配列の限界を、ＩＮＳがコード領域内にあるのか若しくは３′ＵＴＲにあるのかまたはその両方なのかを、簡単かつ迅速に検出し、および／またはさらに細かく規定するのに使うことのできる、ある例示されたコンストラクトにも関する。遺伝子のＩＮＳ領域がこれらのベクターの利用を通じて位置決定され、および／もしくはさらに細かく規定されれば、その同じベクターは、遺伝子のコード能に影響することなく同定されたＩＮＳを排除する変異導入実験にも使うことができ、これによりこれらの変異遺伝子を含む発現ベクターから生産される蛋白質の量を増加させることが可能となる。本発明はまた、これらのコンストラクトの利用法、およびこれらのコンストラクトを含む宿主細胞にも関する。
ｍＲＮＡ内の不安定／阻害領域を検出するのに用いることができる、本発明のコンストラクトは、ベクターｐ１９、ｐ１７Ｍ１２３４、ｐ３７Ｍ１２３４およびｐ３７Ｍ１－１０Ｄ（図１（Ｂ）および図６に示されている）により例示される。ｐ３７Ｍ１２３４およびｐ３７Ｍ１－１０Ｄは、ｇａｇインジケーター／レポーター蛋白質の発現量のいかなる変化も簡単かつ迅速に検出できる市販のＥＬＩＳＡ試験があることから、好ましいコンストラクトである。しかし、前記の図１（Ｂ）および図６のコンストラクトでロングターミナルリピートに挟まれたエレメントを含み、ｍＲＮＡ内の不安定／阻害領域を検出するのに用いることのできる、いかなるコンストラクトも本発明の一部である。
阻害／不安定配列の存在は、当該分野において既に知られているが、遺伝子のコード能を変えることなく多重ヌクレオチド置換を施すことにより、これらの配列をコード領域内に含むｍＲＮＡをコードする遺伝子の発現を増大させる問題に対する解決法は、今まで開示

されていない。

【図面の簡単な説明】

図１．（Ａ）はＨＩＶ－１ゲノムの構造である。ボックスは異なるウイルス遺伝子を示す。（Ｂ）はｇａｇ発現プラスミドの構造（下記参照）である。プラスミドｐ１７は完全なＨＩＶ－１　５′ＬＴＲおよびヌクレオチド（nt）２５７にあるＢｓｓＨＩＩ制限部位までの配列を含む（ヌクレオチドの番号付けは、ＨＩＶ－１分子クローンｐＨＸＢ２の改訂ヌクレオチド配列に関する（Ｇ．マイヤーズ（Myers）ら編、Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysisl of nucleic acid and amino acid sequences（ロスアラモス国立研究所、ロスアラモス、ニューメキシコ、1991）（本明細書中で参考事項に取り入れられている））。この配列の後ろには、ｎｔ３３６－７３１に渡るｐ１７ｇａｇコード配列（白抜きボックスとして表されている）が続いており、さらにその直後には翻訳終止コドンおよびリンカー配列が続いている。リンカーに隣接しているのは、Ｕ５領域のｎｔ８５６１から最後のヌクレオチドまでのＨＩＶ－１　３′ＵＴＲである。プラスミドｐ１７Ｒは、加えて、ＲＲＥを囲む３３０ｎｔ　ＳｔｙＩ断片（Ｌ．ソロミン（Solomin）ら、J.Virol. 64:6010-6017（1990））（斑点ボックスで示されている）をｐ１７ｇａｇコード配列の３′側に含む。ＲＲＥの後ろには、３′ＵＴＲのＵ５領域のｎｔ８０２１から最後のヌクレオチドまでのＨＩＶ－１配列が続く。プラスミドｐ１９およびｐ１９Ｒは、それぞれ、プラスミドｐ１７およびｐ１７ＲのＨＩＶ－１　ｐ１７ｇａｇコード配列をＲＳＶ　ｐ１９ｇａｇコード配列（黒ボックスで示されている）で置き換えることにより作製された。プラスミドｐ１７Ｍ１２３４は、ｇａｇコード領域内に２８のサイレントヌクレオチド置換（ｘｘｘで示されている）がある以外は、ｐ１７と同一である。波線はプラスミド配列を表す。プラスミドｐ１７Ｍ１２３４（７３１－１４２４）およびプラスミドｐ３７Ｍ１２３４は、すぐ後、およびその他の箇所において記載する。これらのベクターは、特定のヌクレオチド配列がＩＮＳをコードするかを決定するのに用いることのできるコンストラクトの例示である。この場合、インジケーター遺伝子（ここではｐ１７ｇａｇ）を含むベクターｐ１７Ｍ１２３４はコントロールベクターを表し、ベクターｐ１７Ｍ１２３４（７３１－１４２４）およびｐ３７Ｍ１２３４は、問題となるヌクレオチド配列（ここではｐ２４ｇａｇコード配列）がそれぞれ、インジケーター遺伝子の終止コドンの３′側のベクターに挿入されているか、若しくはインジケーター遺伝子のコード領域にインフレームで融合されているベクターを表す。（Ｃ）はｇａｇＩＮＳを同定、およびさらに変異導入するための発現ベクターの構築法である。ｐ１７Ｍ１２３４をベクターとして用いて、改変ｐ１７ｇａｇ遺伝子のコード領域の下流に付加的なＨＩＶ－１　ｇａｇ配列が挿入された。ヌクレオチド番号により示された３つの異なる断片を、以下に記すようにベクターｐ１７Ｍ１２３４に挿入した。プラスミドｐ１７Ｍ１２３４（７３１－１０８１）、ｐ１７Ｍ１２３４（７３１－１４２４）およびｐ１７Ｍ１２３４（７３１－２１６５）を作製するために、示された断片をｐ１７Ｍ１２３４のｐ１７ｇａｇコード配列の終止コドンの３′側に挿入した。発現アッセイ（データは示していない）において、ｐ１７Ｍ１２３４（７３１－１０８１）およびｐ１７Ｍ１２３４（７３１－１４２４）が高レベルのｐ１７ｇａｇ蛋白質を発現した。対照的に、ｐ１７Ｍ１２３４（７３１－２１６５）はｐ１７ｇａｇ蛋白質を発現せず、このＨＩＶ－１　ｇａｇコード領域内に付加的なＩＮＳが存在することを示している。プラスミドｐ１７Ｍ１２３４（７３１－１０８１）ＮＳ、ｐ３７Ｍ１２３４およびｐ５５Ｍ１２３４を作製するために、改変ｐ１７ｇａｇ遺伝子の末端の終止コドンおよびｐ１７Ｍ１２３４の全てのリンカー配列をオリゴヌクレオチド部位特異的変異導入により取り除き、得られたプラスミドは、ＨＩＶ－１と同様のｇａｇオープンリーディングフレームを回復した。発現アッセイ（データは示していない）において、ｐ３７Ｍ１２３４は、ウェスタンブロットおよびＥＬＩＳＡアッセイにより決定したところ、高いレベルの蛋白質を発現したが、ｐ５５Ｍ１２３４は検出可能なｇａｇ蛋白質を発現しなかった。以上のことから、ｐ２４領域の３′側の配列の付加は蛋白質発現の排除をもたらし、ヌクレオチド配列１４２４－２１６５にはＩＮＳが含まれることが示された。本実験は、ｐ３７Ｍ１２３４が付加的なＩＮＳを解析するのに適したベクターであ

ることを示した。
図２．種々のベクターからのｇａｇ発現。（Ａ）Ｒｅｖの非存在下（－）若しくは存在下（＋）で、ＨＬｔａｔ細胞をプラスミドｐ１７、ｐ１７Ｒもしくはｐ１７Ｍ１２３４でトランスフェクトした（下記参照）。トランスフェクトした細胞をヒトＨＩＶ－１　患者血清を用いた免疫ブロットにより分析した。（Ｂ）Ｒｅｖの非存在下（－）若しくは存在下（＋）で、プラスミドｐ１９若しくはｐ１９ＲをＨＬｔａｔ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をウサギ抗ＲＳＶ　ｐ１９ｇａｇ血清を用いた免疫ブロットにより分析した。ＨＩＶもしくはＲＳＶ蛋白質群は同じゲルにおけるマーカーとして使った。ｐ１７ｇａｇおよびｐ１９ｇａｇの位置を右に示す。
図３．ノザンブロットでのｍＲＮＡ分析。（Ａ）Ｒｅｖの非存在下（－）若しくは存在下（＋）で、ＨＬｔａｔ細胞を示されたプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞から調製した２０μｇの全ＲＮＡを分析した（下記参照）。（Ｂ）ｐ１９若しくはｐ１９ＲからのＲＮＡ産生を、Ｒｅｖの非存在下（－）若しくは存在下（＋）で、同様に分析した。
図４．ＨＩＶ－１　ｐ１７ｇａｇ領域のヌクレオチド配列。全ての変異を作製するのに用いられる４つのオリゴヌクレオチド（Ｍ１－Ｍ４）の位置を下線で示す。各変異導入オリゴヌクレオチドにより導入されたサイレントヌクレオチド置換を、コード配列の下に示す。番号付けはウイルスｍＲＮＡのｎｔ　＋１から始まる。
図５．種々の変異体によるｇａｇ発現。図の上部に示した様々なプラスミドで、ＨＬｔａｔ細胞をトランスフェクトした。プラスミドｐ１７ＲはＲｅｖの非存在下（－）若しくは存在下（＋）でトランスフェクトしたが、他のプラスミドはＲｅｖ非存在下で分析した。ｐ１７ｇａｇ産生を図２に記したような免疫ブロットによりアッセイした。
図６．ｇａｇ領域中の付加的なＩＮＳエレメントの同定および排除に使われる発現ベクター。各ベクターに含まれるｇａｇおよびｐｏｌ領域のヌクレオチドを線により示す。ｇａｇおよびｐｏｌオリゴヌクレオチドのいくつかの位置を図の上部に示し、ｐ１７ｇａｇ、ｐ２４ｇａｇ、ｐ１５ｇａｇ、プロテアーゼおよびｐ６６ｐｏｌ蛋白質のコード領域に関しても同様である。種々のオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いてベクターｐ３７Ｍ１２３４をさらに変異導入した。得られた変異体の一つは、発現後、高いレベルのｐ２４を与えた。これを配列決定により分析し、４つの変異オリゴヌクレオチドＭ６ｇａｇ、Ｍ７ｇａｇ、Ｍ８ｇａｇおよびＭ１０ｇａｇを含むことが分かった。異なるオリゴの組み合わせを含む他の変異体は、発現の増加を示さず、または部分的な発現増加しか示さなかった。ｐ５５ＢＭ１－１０およびｐ５５ＡＭ１－１０はｐ３７Ｍ１－１０Ｄに由来した。ｐ５５Ｍ１－１３Ｐ０は、オリゴヌクレオチドＭ１１ｇａｇ、Ｍ１２ｇａｇ、Ｍ１３ｇａｇおよびＭ０ｐｏｌに含まれる、付加的な変異をｇａｇおよびｐｏｌ領域に含む。斜線のボックスは変異オリゴヌクレオチドの位置を示し；丸のついた斜線ボックスはＡＴＴＴＡ配列（ｍＲＮＡの不安定性および／もしくは阻害に寄与する可能性がある）を含む変異領域を示し；そして三角のついた白抜きのボックスはＡＡＴＡＡＡ配列（ｍＲＮＡの不安定性および／もしくは阻害に寄与する可能性がある）を含む変異領域を示す。上記のトランスフェクション後のヒト細胞におけるｐ２４ｇａｇの典型的な発現レベルは、右に示す（ｐｇ／ｍｌ）。
図７．ｅｎｖ発現を研究するのに使われる真核細胞発現プラスミド。種々の発現プラスミドはｐＮＬ１５Ｅ（シュワルツ（Schwartz）ら、J.Virol. 64:5448-5456（1990））に由来する。種々のコンストラクトの作製は本文に記載されている。番号付けは訂正されたＨＸＢ２配列（マイヤーズら、1991、上記；ラトナー（Ratner）ら、Hamatol.Bluttransfus. 31:404-406（1987）；ラトナーら、AIDS Res.Hum.Retroviruses 3:57-69（1987）；ソロミン（Solomin）ら、J.Virol. 64:6010-6017（1990））に従い、Ｒの最初のヌクレオチドを＋１として始めた。５′ＳＳは５′スプライス部位；３′ＳＳは３′スプライス部位である。
図８．ｅｎｖ発現は機能的なスプライス部位がないとＲｅｖ依存性である。ｒｅｖ発現プラスミド（ｐＬ３ｃｒｅｖ）非存在下もしくは存在下で、プラスミドｐ１５ＥＳＤ－およ

びｐ１５ＥＤＳＳ（Ｃ）をＨＬｔａｔ細胞にトランスフェクトした。１日後、細胞をＲＮＡおよび蛋白質の分析用に回収した。全ＲＮＡを抽出しノザンブロット分析した（Ｂ）。ブロットはＨＸＢ２のＸｈｏＩ－ＳａｃＩ（ｎｔ８４４３－９１１８）に渡るニックトランスレートプローブでハイブリダイズした。蛋白質生産は、ウェスタンブロットにより測定し、ＨＩＶ－１患者血清およびウサギ抗ｇｐ１２０抗体の混合物を用いて細胞関連性Ｅｎｖを検出した（Ａ）。

図９．ｇｐ１２０発現プラスミドからのＥｎｖ産生。示されたプラスミドを２つのプレート内でＨＬｔａｔ細胞にトランスフェクトした。ｒｅｖ発現プラスミド（ｐＬ３ｓｒｅｖ）を示されたように共トランスフェクトした。１日後、ＲＮＡおよび蛋白質の分析用に細胞を回収した。全ＲＮＡを抽出しノザンブロット分析した（Ａ）。ブロットはｎｔ６１５８－７９２４に渡るニックトランスレートプローブを用いてハイブリダイズした。蛋白質生産（Ｂ）は、２００ｍＣｉ／ｍｌの^{35}Ｓ－システインで５時間ラベルした後、免疫沈降により測定し、分泌型の加工（プロセシング）されたＥｎｖ（ｇｐ１２０）を検出した。

図１０．ｐ１９（ＲＳＶ　ｇａｇ）試験系を用いたｇｐ１２０およびｇｐ４１内のＩＮＳエレメントの同定。ｅｎｖ　ＯＲＦを含むエクソン５Ｅの概略構造。ｇｐ４１部分の種々の断片（ＡからＧ）およびｖｐｕ／ｇｐ１２０部分の断片ＨをＰＣＲ増幅し、ｐ１９のＲＳＶ　ｇａｇ遺伝子の下流に位置する唯一のＥｃｏＲＩ部位に挿入した。増幅された断片に含まれる配列の位置は、ＨＸＢ２Ｒ番号付けの系を用いて右に示す。断片ＡおよびＢは、それぞれ、ｐＮＬ１５ＥおよびｐＮＬ１５ＥＤＳＳ（スプライス受容部位７Ａ、７Ｂおよび７が欠失している）から同じオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅した。それら長さはそれぞれ２７６および２３４ヌクレオチドである。断片ＣはｐＮＬ１５ＥＤＳＳから３２３ヌクレオチド断片として増幅された。断片Ｆは３６２ヌクレオチドのＨｐａＩ－ＫｐｎＩ制限断片である。断片ＥはｐＮＬ１５ＥＤＳＳから６６８ヌクレオチド断片として増幅され、それ故、ＨＸＢ２のヌクレオチド５５９２にある主要なスプライスドナーが欠失している。残りの断片は図に示されたようにｐＮＬ１５Ｅから増幅した。ＨＬｔａｔ細胞をこれらのコンストラクトでトランスフェクトした。１日後、細胞を回収し、ｐ１９ｇａｇ産生を抗ＲＳＶＧａｇ抗体を用いたウェスタンブロット分析により決定した。これらのプラスミドからのＧａｇの発現をｐ１９のＧａｇ産生と比較した。ＳＡはスプライス受容部位；ＢはＢａｍＨＩ；ＨはＨｐａＩ；ＸはＸｈｏＩ；ＫはＫｐｎＩである。種々の断片内に含まれるＩＮＳの下降調節効果を右に示す。

図１１．ｐ３７Ｍ１－１０Ｄ（変異ＩＮＳ　ｐ３７ｇａｇ発現系）試験系を用いたｇｐ１２０およびｇｐ４１内のＩＮＳエレメントの同定。ｅｎｖ　ＯＲＦの概略構造。ｅｎｖの種々の断片（１から７）を図に示されたようにしてＰＣＲ増幅し、ｐ３７Ｍ１－１０Ｄのｐ３７変異ｇａｇ遺伝子の下流に位置するポリリンカーに挿入した。断片１から６は分子クローンｐＬＷ２．４（Ｍ．ライツ（Reitz）博士から贈られた、ＨＸＢ２Ｒに非常に似ている）から増幅された。クローンｐＬＷ２．４は、同じＨＩＶ－１株ＩＩＩＢ（ＨＸＢ２Ｒ分子クローンはこれに由来する）に感染した個体からのものであった。断片７はｐＮＬ４３からクローン化した。一貫性と明確性のため、番号付けはＨＸＢ２Ｒの系に従う。これらのコンストラクトでＨＬｔａｔ細胞をトランスフェクトした。１日後、細胞を回収し、ｐ２４ｇａｇ生産を抗原捕獲アッセイにより決定した。これらのプラスミドからのＧａｇの発現を、ｐ３７Ｍ１－１０ＤのＧａｇ産生と比較した。各断片の下降調節効果を右に示す。

図１２．ｐｏｌ領域のＣＲＳのネガティブ効果の排除。ＨＩＶ－１のヌクレオチド３７００－４１９４を示されるようにベクターｐ３７Ｍ１２３４に挿入した。これによりｇａｇの発現が阻害された。変異オリゴヌクレオチドＭ９ｐｏｌ－Ｍ１２ｐｏｌ（Ｐ９－Ｐ１２）を用いて、幾つかの変異ＣＲＳクローンを分離し性格付けした。それらの内の一つ、ｐ３７Ｍ１２３４ＲＣＲＳＰ１０＋Ｐ１２ｐは、図１３に示される変異を含む。本クローンは高いレベルのｇａｇを生産した。それ故、ｐ３７Ｍ１２３４ＲＣＲＳＰ１０＋Ｐ１２ｐにおける変異の組み合わせはＩＮＳを排除し、一方、Ｐ１０もしくはＰ１２領域のみの変異ではＩＮＳを排除していなかった。

図１３．ｐｏｌ領域（ヌクレオチド３７００－４１９４）のＣＲＳのネガティブ効果を排除する点変異群。ＨＩＶ－１　ｐｏｌ（ヌクレオチド３７００－４１９４）のＣＲＳ領域内の阻害／不安定エレメントを完全に不活化することのできる変異の組み合わせを、配列の下に小文字で示す。これらの変異は、オリゴヌクレオチドＭ１０ｐｏｌおよびＭ１２ｐｏｌ内に含まれる（表２参照）。Ｍ１２ｐｏｌオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡシークエンスにより決定にたところ、ｐ３７Ｍ１２３４ＲＣＲＳＰ１０＋Ｐ１２ｐ（図１２参照）には導入されなかった変異がさらに含まれている。

図１４．効率のよいｇａｇ発現ベクターｐ３７Ｍ１－１０Ｄのプラスミドマップおよびヌクレオチド配列。（Ａ）ベクターｐ３７Ｍ１－１０Ｄのプラスミドマップ。本プラスミドは、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＫＳ（－）の骨組み、ｐＮＬ４３ゲノムクローンに見られるようなＨＩＶ－１配列の側部のヒトゲノム配列、ＨＩＶ－１　ＬＴＲおよびｐ３７ｇａｇ領域（ｐ１７およびｐ２４）を含む。本文に記載されているように、ｐ１７領域はオリゴヌクレオチドＭ１からＭ４を用いて変異導入され、ｐ２４領域はオリゴヌクレオチドＭ６、Ｍ７、Ｍ８およびＭ１０を用いて変異導入された。ｐ３７のコード領域の側部には、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルを提供する５′および３′ＨＩＶ－１　ＬＴＲがある（矢印で示されている）。３つの連続した矢印は、それぞれ、ＬＴＲのＵ５、ＲおよびＵ３領域を示す。ＬＴＲの転写される部分は黒で示されている。ｐ２４コード領域の終りに挿入された翻訳終止コドンは１８１８番に示されている。いくつかの制限エンドヌクレアーゼ切断部位も示されている。（Ｂ－Ｄ）ｐ３７Ｍ１－１０Ｄの完全なヌクレオチド配列。ｐ３７ｇａｇ蛋白質のアミノ酸配列をコード領域の下に示す。略号は上記の通りである。番号付けは５′ＬＴＲの最初のヌクレオチドから始まる。

Ｖ．発明の実施様式

上記の一般的な解説および下記の詳細な解説は共に、単なる例示および説明であって、請求の範囲にあるもののみに本発明を制限するものではないことは、理解されるべきである。本明細書の一部に取り入れられ、かつその一部をなす付属の図面は、本発明の態様を例示し、解説と合わせて、本発明の原理を説明するのに役立っている。

本発明は、（ａ）遺伝子内の阻害／不安定領域を同定し、そして（ｂ）多重点変異を施すことにより遺伝子内阻害／不安定領域に変異を導入することによって、ｍＲＮＡの遺伝子内阻害／不安定領域を排除する方法を含む。これらの変異は密集（クラスター）していてもよい。本方法はＩＮＳの正確な位置の同定も、ＩＮＳの機能機構の知識も必要としない。それでも、本明細書中に示される結果から、ｍＲＮＡ内の複数の領域が安定性および利用性の決定に参与し、これらのエレメントの多くがＲＮＡ輸送、ターンオーバー、および／もしくは局在のレベルで作用していると結論することができる。一般的に、変異はｍＲＮＡによりコードされるアミノ酸配列が変化しないようなものであるが、しかし、保存的および非保存的アミノ酸置換（但し、変異遺伝子によりコードされる蛋白質は、非変異遺伝子によりコードされる蛋白質と実質的に同様であるもの）も本発明の一部である。

改変されるべきヌクレオチドは無作為に選択することができ、唯一要求されることは、蛋白質によりコードされるアミノ酸配列が不変のままであることで；または、保存および非保存的アミノ酸置換がなされる場合、唯一要求されることは、変異遺伝子によりコードされる蛋白質が非変異遺伝子によりコードされる蛋白質と実質的に同様であることである。ＩＮＳ領域がＡＴ豊富であるか若しくはＧＣ豊富である場合、ＧおよびＣの含量が約５０％、並びにＡおよびＴの含量が約５０％となるようにＩＮＳを改変するのが望ましい。ＩＮＳ領域が使用頻度の低いコドンを含む場合、使用頻度の高いコドンにＩＮＳを改変するのが望ましい。しかし、場合によっては（例えば、ＡおよびＴの豊富な領域をＧおよびＣの豊富な領域にするために）、使用頻度の高いコドンを使用頻度の低いコドンに改変することもできる。ＩＮＳ領域が保存されたヌクレオチドを含む場合、それらの保存されたヌクレオチドのいくつかを非保存的なヌクレオチドに改変してもよい。ここで再び、唯一要求されることは、蛋白質によりコードされるアミノ酸配列が不変のままであることで；または、保存および非保存的アミノ酸置換がなされる場合、唯一要求されることは、変異遺伝子によりコードされる蛋白質が非変異遺伝子によりコードされる蛋白質と実質的に同様

であることである。
本明細書中で使われる場合、保存されたヌクレオチドとは、それらのヌクレオチドが阻害／不安定決定に関わるシグナルの一部であるという事実を進化的保存が反映し得るという理由から、ある遺伝子に関して進化的に保存されたヌクレオチドを意味する。保存されたヌクレオチドは一般的には、問題となる遺伝子に関して発表された参考文献から、若しくは当該分野の実践者が利用可能な種々のコンピュータープログラムを用いることにより決定することができる。
様々な生物に関する使用頻度の低いコドンおよび高いコドンは、Ｔ．マルヤマ（Maruyama）ら、Nucl.Acids.Res. 14:r151-r197（1986）およびＳ．アオタ（Aota）ら、Nucl.Acids.Res. 16:r315-r402（1988）に示されているようなコドン利用表から、または1992年１月21日に発行されたＧ．Ｗ．ハットフィールド（Hatfield）らによる”Codon Pair Utilization”という名称の米国特許第５，０８２，７６７号に開示されているようなコンピュータープログラム（本明細書中で参考事項に取り入れられている）を用いることにより決定することができる。
一般的に、本発明の方法は以下のように実施する：
１．ＩＮＳを含むｍＲＮＡの同定
特定の蛋白質が作られる割合は、それをコードするｍＲＮＡの細胞質のレベルに比例するのが普通である。従って、阻害／不安定配列を含むｍＲＮＡをコードする候補は、そのｍＲＮＡもしくは蛋白質が検出できるほどには発現していないか、または同じ、若しくは同様の強さのプロモーターの制御下にある対照ｍＲＮＡもしくは蛋白質の発現レベルと比較して僅かしか発現しないものである。同じ若しくは同様の強さのプロモーター制御下にある別の遺伝子からの定常状態レベルと比較した時の、見掛けの転写速度（例えば、核ラン－オンアッセイにより決定される）における変化では説明できない、特定のｍＲＮＡの定常状態レベル（例えばノザンブロッティングにより決定される）における相違は、その遺伝子が不安定ｍＲＮＡをコードする候補であることを示す。不安定に加えて、若しくは不安定とは別に、細胞質で働く様々な阻害機構により細胞質ｍＲＮＡがあまり利用されないこともある。これらの効果は、本明細書で「阻害配列」と名付けられている特定のｍＲＮＡ配列により調節されている可能性がある。
阻害／不安定領域を含むｍＲＮＡ候補には、その発現が厳密に調節される遺伝子からのｍＲＮＡ（例えば多くの癌遺伝子、増殖因子遺伝子およびインターロイキンなどの生物学的応答のモディファイヤーの遺伝子）が含まれる。これらの遺伝子の多くは、発現が非常に低レベルで、速やかに分解され、そして状況が変化すると素早く且つ一過的な調整を受ける。ｍＲＮＡ安定性および利用性のレベルにおける、負の発現調節は幾つかのケースで記録されており、他の多くのケースにおいてもその存在が提唱されている。ｍＲＮＡの阻害／不安定領域の存在による転写後調節に関する証拠がある遺伝子の例としては、顆粒球－単球コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、原癌遺伝子ｃ－ｍｙｃ、ｃ－ｍｙｂ、ｃ－ｓｉｓ、ｃ－ｆｏｓ；インターフェロン（アルファ、ベータおよびガンマＩＦＮ）；インターロイキン（ＩＬ１、ＩＬ２およびＩＬ３）；腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）；リンホトキシン（Ｌｙｍ）；ＩｇＧ１誘導因子（ＩｇＧ　ＩＦ）；顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）；トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）；およびガラクトシルトランスフェラーゼ関連蛋白質（ＧＴＡ）をコードする細胞性遺伝子；ｅｎｖ、ｇａｇおよびｐｏｌをコードするＨＩＶ－１遺伝子；６－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ（ｇｎｄ）およびｂｔｕＢをコードする大腸菌遺伝子；並びにＭＡＴα１をコードする酵母遺伝子（上記の“従来の技術”の章における考察を参照）が含まれる。ＭＡＴα１酵母遺伝子およびｇａｇ、ｅｎｖおよびｐｏｌのＨＩＶ－１遺伝子の他に、細胞性原癌遺伝子ｃ－ｍｙｃおよびｃ－ｆｏｓをコードする遺伝子は、非コード領域内の阻害／不安定領域に関する証拠に加えて、コード領域内の阻害／不安定領域に関する証拠がある遺伝子である。コード領域内に阻害／不安定領域を含むｍＲＮＡをコードする若しくはコードすると思われる遺伝子は、本発明に特に関連性がある。
不安定な、もしくは殆ど利用されないｍＲＮＡ候補が同定されれば、パルス－チェイス実

験（即ち、放射性前駆体で新しく合成されたＲＮＡを標識し、ラベルのない状態で放射性標識されたｍＲＮＡの分解を追跡する）を行うことにより；またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写されたｍＲＮＡを（マイクロインジェクション、リン酸カルシウム沈殿法、電気穿孔法もしくは当該分野で知られる他の方法によって）標的細胞に導入し、その規定されたｍＲＮＡ集団のｉｎ　ｖｉｖｏでの半減期を追跡することにより；または、誘導することができ、誘導後即座に転写を遮断するプロモーターから研究対象のｍＲＮＡを発現させ、この短い転写バーストの間に合成されたｍＲＮＡの半減期を評価することにより；または、薬剤（例、アクチノマイシンＤ）で転写をブロックし、薬の添加後様々な時点でノザンブロッティングもしくはＲＮＡプロテクション（例、Ｓ１ヌクレアーゼ）アッセイによって特定のｍＲＮＡの崩壊を追うことにより、ｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏでの半減期（もしくは安定性）を研究することができる。上記決定法の全てに関する方法はよく確立されている。例えば、Ｍ．Ｗ．ヘンツ（Hentze）ら、Biochem.Biophys.Acta 1090:281-292（1991）およびそこに記されている参考文献を参照していただきたい。また例えば、Ｓ．シュワルツら、J.Virol.66:150-159（1992）も参照していただきたい。最も有用な測定法は、可能な全てのＩＮＳ機構を包含することから、蛋白質の生産量を測ることである。ＩＮＳを含むことが示されている、もしくはＩＮＳを含むと思われる様々なｍＲＮＡの例は、先に記載されている。これらのｍＲＮＡの中には、ノザンブロットによりそのｍＲＮＡレベルを測定すると、３０分未満の半減期を持つことを示されているものもある（例えば、Ｄ．ウレシュナー（Wreschner）とＧ．レハビ（Rechavi）、Eur.J.Biochem.172:333-340（1988）を参照）。

２．不安定性決定要素の位置決定

不安定な、若しくはあまり利用されないｍＲＮＡが同定されると、次の工程は、それを担う（ｃｉｓ作用性）ＲＮＡ配列エレメントを調べることである。ｃｉｓ作用性阻害／不安定領域の位置決定に関する詳細な方法は、上記“従来の技術”の章に記載された参考事項の各々に示されており、以下にも考察される。本発明の例示されたコンストラクトもＩＮＳの位置決定に利用することができる（下記参照）。特定のｍＲＮＡターンオーバーを担うｃｉｓ作用性配列は、ｍＲＮＡ安定性の変化した自然に生じた変異体が時たま同定されることによる以外に、欠失および点変異導入によって同定することができる。

短く述べると、推定調節配列がｍＲＮＡ安定性制御の賦与に十分であるかを評価するために、ＩＮＳと思われる領域をコードするＤＮＡ配列をインジケーター（若しくはレポーター）遺伝子に融合させ、ハイブリッドｍＲＮＡをコードする遺伝子を創作する。インジケーター（若しくはレポーター）遺伝子に融合されたＤＮＡ配列は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡもしくは合成ＤＮＡでもよい。“従来の技術”の章で示された参考文献に記載されたインジケーター（若しくはレポーター）遺伝子の例には、β－グロビン、ＰＧＫ１およびＡＣＴ１の遺伝子と同様に、ネオマイシン、β－ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、およびルシフェラーゼの遺伝子が含まれる。サムブルック（Sambrook）ら、Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第２版、Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor, ニューヨーク、（1989）, 16.56-16.67頁を参照していただきたい。インジケーター遺伝子として使うことのできる他の遺伝子は、本明細書中に開示されている（即ち、ラウス肉腫ウイルスのｇａｇ遺伝子（阻害／不安定領域を欠いている）並びに、コンストラクトｐ１７Ｍ１２３４、ｐ３７Ｍ１２３４およびｐ３７Ｍ１－１０ＤのＲｅｖ非依存性ＨＩＶ－１ｇａｇ遺伝子（変異導入により阻害／不安定領域を不活化してあり、本発明の一つの側面を成している））。一般的に、安定な、若しくは比較的高レベルに発現するｍＲＮＡをコードする、実質的にいかなる遺伝子（そのｍＲＮＡもしくは発現された蛋白質レベルに少しでも減少があれば標準的な方法により検出できるほど、十分安定な、若しくは十分高レベルに発現されるものとして本明細書中では定義される）も、インジケーターもしくはレポーター遺伝子として利用することができる。もっとも、本明細書中で例示されるコンストラクトｐ３７Ｍ１２３４およびｐ３７Ｍ１－１０Ｄが下記の理由から望ましい。これらのコンストラクトを用いたハイブリッド遺伝子を創作し、これらのコンストラクトからのｍＲＮＡおよび蛋白質の発現を試験する

のに好適な方法も、以下に示される。
一般的に、インジケーター遺伝子、およびＩＮＳ領域をコードすると思われる配列に融合されたインジケーター遺伝子から成るハイブリッド遺伝子により生産されるｍＲＮＡの安定性および／もしくは利用性は、ｍＲＮＡをクローン化し発現するのに使われる発現ベクターに適した宿主細胞にハイブリッド遺伝子をトランスフェクトすることにより試験される。その結果得られるｍＲＮＡのレベルを、ｍＲＮＡ安定性を決定する標準的な方法、例えばノザンブロット、Ｓ１マッピング若しくはＰＣＲ法によって決定し、結果として得られる蛋白質生産レベルを、ＥＬＩＳＡ、免疫沈降法および／もしくはウェスタンブロットなどの蛋白質測定アッセイによって定量する。阻害／不安定領域（複数ある場合は、領域群）は、コントロールインジケーターｍＲＮＡと比較した場合の蛋白質発現および／もしくはハイブリッドｍＲＮＡの安定性の減少により同定されるだろう。最終的な目標がコードされる蛋白質の産生を増大させることである場合、蛋白質の産生に使われるのと同じ宿主細胞においてＩＮＳの同定を実施するのが最も望ましい。
ＩＮＳ配列の同定に使われてきた幾つかの宿主細胞の例としては、哺乳動物体細胞、Ｘｅｎｏｐｕｓ卵母細胞、酵母および大腸菌が含まれる。例えば、β－グロビン遺伝子の３′ＵＴＲに推定阻害配列を挿入し、これをマウスもしくはヒト宿主細胞にトランスフェクトした際に該配列がないと安定なβ－グロビンｍＲＮＡが不安定になることから、ＧＭ－ＣＳＦの不安定配列の位置決定をしたＧ．ショー（Shaw）とＲ．カーメン（Kamen）、Cell 46:659-667（1986）（上記）を参照していただきたい。また、ラット繊維芽細胞に導入されたハイブリッドｃ－ｍｙｃ－ネオマイシン耐性遺伝子を用いてｃ－ｍｙｃの阻害／不安定配列の位置決定をしたＩ．レアード－オフリンガ（Laird-Offringa）ら、Nucleic Acids Res. 19:2387-2394（1991）；および、大腸菌に導入されたハイブリッドｂｔｕＢ－ｌａｃＺ遺伝子を用いてｂｔｕＢ遺伝子の阻害／不安定配列の位置決定をしたＭ．ランジグラン（Lundigran）ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:1479-1483（1991）も参照していただきたい。ＨＩＶ－１の特定の転写産物内の阻害／不安定配列の位置を、それがなければ長い寿命を持つようなインジケーター転写産物を不安定化することによって決定した報告例としては、例えば、Ｍ．エマーマン（Enerman），Cell 57:1155-1165（1989）（ｅｎｖ遺伝子の３′ＵＴＲをＨＢＶの一部で置き換え、ＣＯＳ－１細胞に導入した）；Ｓ．シュワルツら、J.Virol.66:150-159（1992）（Ｒｅｖ非依存性ｔａｔレポーター遺伝子とのｇａｇ遺伝子融合体をＨｅＬａ細胞に導入した）；Ｆ．マルダレリ（Maldarelli）ら、J.Virol.65:5732-5743（1991）（Ｒｅｖ非依存性ｔａｔレポーター遺伝子もしくはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）遺伝子とのｇａｇ／ｐｏｌ遺伝子融合体をＨｅＬａおよびＳＷ４８０細胞に導入した）；並びにＡ．コックレーン（Cochrane）ら、J.Virol.65:5303-5313（1991）（ＣＡＴ遺伝子もしくはラット　プロインシュリン遺伝子とのｐｏｌ遺伝子融合体をＣＯＳ－１およびＣＨＯ細胞に導入した）を参照していただきたい。
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでｍＲＮＡターンオーバーをアッセイするｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｍＲＮＡ分解系（例えば、細胞質粗抽出液）が、現行のｉｎ　ｖｉｖｏ分析を補い、ｉｎ　ｖｉｖｏ系の制限のいくつかを回避するのに役立つことが予想される。Ｍ．Ｗ．ヘンツら、Biochem.Biophys.Acta 1090:281-292（1991）およびそこに示されている参考文献を参照していただきたい。また、赤血球ライセートの無細胞系で外来性ｍＲＮＡ安定性を解析した、Ｄ．ウレシュナーとＧ．レハビ、Eur.J.Biochem.172:333-340（1988）も参照していただきたい。
本発明の方法では、対象となる遺伝子全体をインジケーターもしくはレポーター遺伝子に融合させ、その遺伝子が阻害／不安定領域（群）を含むかを決定するために、得られたハイブリッドｍＲＮＡに対する効果に関する試験をすることができる。対象の遺伝子内のＩＮＳをさらに詳細に位置決定するために、対象の遺伝子を５′もしくは３′端または両方から逐次的に欠失することによって、対象の遺伝子の断片を調製することができる。対象となる遺伝子は、当該分野で知られている方法（例えば、制限エンドヌクレアーゼなど）によってオーバーラップする断片に分離してもよい。例えば、Ｓ．シュワルツら、J.Viro

l.66:150-159（1992）を参照していただきたい。遺伝子は約３００から２０００ヌクレオチドの長さのオーバーラップする断片に分離するのが望ましい。２つのタイプのベクターコンストラクトが作製できる。機能発現のために翻訳される必要のない阻害／不安定領域の検出を可能とするために、対象の遺伝子（もしくはその断片またはＩＮＳと思われる領域）をインジケーター若しくはレポーター遺伝子の終止コドンの下流の３′ＵＴＲに挿入することができるように、ベクターを構築することができる。これによりＩＮＳを通じた翻訳は行われない。いくつかの阻害／不安定配列がｍＲＮＡの翻訳後にしか作用しえないという可能性を試験するために、対象の遺伝子（もしくはその断片またはＩＮＳと思われる領域）をインジケーター若しくはレポーター遺伝子のコード領域に挿入するように、ベクターを構築することができる。本方法により、機能発現に翻訳を必要とする阻害／不安定領域の検出が可能となるだろう。本ハイブリッドコンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトし、その結果得られるｍＲＮＡレベルを、上述のような、および“従来の技術”の章に示された参考文献の大部分に記載されているようなｍＲＮＡ安定性を決定する標準法（例えば、ノザンブロット、Ｓ１マッピングもしくはＰＣＲ法）により決定する。また、実験法に関して、サムブルックら、（1989）（上記）も参照していただきたい。このような遺伝子から生産される蛋白質も、ＥＬＩＳＡ、免疫沈降法およびウェスタンブロットなどの、現存のアッセイ（“従来の技術”の章に示された参考文献の大部分にも記載されている）によって容易に定量される。また、実験法に関して、サムブルックら、（1989）（上記）も参照していただきたい。阻害／不安定領域（複数ある場合は領域群）を含むハイブリッドＤＮＡは、コントロールインジケーターｍＲＮＡと比較した際の、蛋白質発現および／もしくはハイブリッドｍＲＮＡの安定性の減少によって同定されるだろう。遺伝子の様々な断片を使うことにより、独立に機能する（もしあれば）複数の阻害／不安定領域の同定が可能となる。一方、オーバーラップする断片を使うことにより、例えば半分に切断された結果、阻害／不安定領域が同定されなくなる可能性を低下させる。

本明細書中に記載された図１（Ｂ）および図６に示された例示試験ベクター、例えば、ベクターｐ１７Ｍ１２３４、ｐ３７Ｍ１２３４、ｐ３７Ｍ１－１０Ｄおよびｐ１９を用いて、様々なＲＮＡにおいて、コード領域内にあるＩＮＳを含めて、ＩＮＳの存在および局在に関してアッセイすることができる。これらのベクターを用いて、まだ調べられていない問題の遺伝子が変異導入回復の候補となるＩＮＳを持つかどうかを決定することもできる。これらのベクターは、同定されたＩＮＳをその遺伝子のコード能に影響することなく排除する、本発明の変異導入工程（以下に記載）に同じベクターを使用することができる点で、従来の技術よりも特に有利である。

これらのベクターを用いる方法は、遺伝子全体、ｃＤＮＡ全体もしくはおよそ３００ヌクレオチドからおよそ２キロベースの範囲の遺伝子断片を、唯一の制限酵素部位（遺伝子工学的にベクターに導入された）を用いてｇａｇのコード領域に３′側に導入することを伴う。ＨＬｔａｔ細胞のｇａｇ遺伝子発現を、ＲＮＡおよび蛋白質の両方のレベルで測定し、始めのベクターからの発現と比較する。発現の減少は、変異導入により回復が可能なＩＮＳ候補の存在を示す。図１に例示されたベクターを用いた方法は、対象となる遺伝子全体および遺伝子断片をベクターｐ１７Ｍ１２３４、ｐ３７Ｍ１２３４およびｐ１９に導入することを伴う。断片の大きさは３００－２０００ヌクレオチドの長さが望ましい。プラスミドＤＮＡは大腸菌内で調製し、ＣｓＣｌ法により精製する。

機能発現に翻訳される必要のない阻害／不安定領域の検出を可能にするために、問題の遺伝子全体および遺伝子断片をベクターｐ１７Ｍ１２３４、ｐ３７Ｍ１２３４もしくはｐ１９のｐ１７ｇａｇコード領域の終止コドンの３′側に導入する。翻訳された時にのみ発現に影響を及ぼす阻害／不安定領域が検出できるように、記載されたベクターを操作して、問題の遺伝子全体もしくは遺伝子断片のコード領域を、発現されるｇａｇ蛋白質遺伝子に読み枠が合うように融合することができる。例えば、問題の遺伝子のコード領域の全て若しくは一部を含む断片を、ベクターｐ３７Ｍ１２３４のｇａｇコード配列の終止コドンにすぐ３′に挿入することができ、ｇａｇの終止コドンおよびリンカー配列をオリゴヌクレオチド変異導入により取り除いて、ｇａｇの読み枠が問題の遺伝子の読み枠に融合するよ

うにすることができる。
次いで、２つの発現ベクター（例、ｇａｇコード領域終止コドンの３′直後に挿入された問題の遺伝子断片を含むｐ３７Ｍ１２３４（ｇａｇ終止コドンがそのままである）およびｇａｇコード領域にインフレームに挿入された問題の遺伝子断片を含むｐ３７Ｍ１２３４（ｇａｇ終止コドンは欠失されている））からのＲＮＡおよび蛋白質生産を、精製されたＤＮＡをＨＬｔａｔ細胞にトランスフェクトした後に比較する。
ヒト細胞へのトランスフェクション後のこれらのベクターの発現をＲＮＡおよび蛋白質生産の両方のレベルでモニターする。ＲＮＡレベルは、例えば、ノザンブロット、Ｓ１マッピングもしくはＰＣＲ法により定量する。蛋白質レベルは、例えば、ウェスタンブロットもしくはＥＬＩＳＡ法により定量する。ｐ３７Ｍ１２３４およびｐ３７Ｍ１－１０Ｄは、ｇａｇ蛋白質の検出に迅速な非放射性ＥＬＩＳＡプロトコールが使える（デュポンもしくはコールターｇａｇ抗原捕獲アッセイ）ので、定量分析には理想的である。ｇａｇ抗原の発現レベルの減少は、対象のクローン化遺伝子もしくは遺伝子断片内に阻害／不安定領域が存在することを示す。
阻害／不安定領域が同定されれば、適当なＩＮＳ断片を含むベクターを用いて一本鎖ＤＮＡを調製し、それから下記のクラスター変異導入プロトコールにおいて特異的な化学合成オリゴヌクレオチドによる変異導入実験に用いることができる。
３．安定なｍＲＮＡを作製するための阻害／不安定領域の変異
阻害／不安定配列がｍＲＮＡのコード領域内に位置決定されると、その遺伝子を改変してこれらの阻害／不安定配列を、該遺伝子のコード能を変えることなく排除する。また、遺伝子を改変して阻害／不安定配列を除くと同時に、保存的もしくは非保存的なアミノ酸置換をコードするように遺伝子のコード能を変える。
本発明の方法において、対象の遺伝子のコード領域にあるＩＮＳを排除するのに最も一般的な方法は、該遺伝子によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を変えることなく、遺伝子もしくは遺伝子断片のＩＮＳ領域に複数の変異を作製することによる；または、保存的および非保存的アミノ酸置換をすべき場合には、唯一要求されることは、変異遺伝子によりコードされる蛋白質が非変異遺伝子によりコードされる蛋白質と実質的に同様であることである。複数ある場合は、阻害／不安定領域と思われる部分全てを同時に変異させるのが望ましい。後に、望むならば、安定なｍＲＮＡを作製するために変異させなければならない遺伝子の最小領域を決定するために、各阻害／不安定領域を独立に変異導入することができる。ＤＮＡの長い領域を一斉に変異導入できれば、求める安定および／もしくは発現の高いｍＲＮＡ並びにその結果生じる蛋白質を生産するのに要する時間および労力を削減することができる。これらの変異を含む改変された遺伝子もしくは遺伝子断片を、それから、上記のように、例えば、改変された遺伝子もしくは遺伝子断片をレポーター若しくはインジケーター遺伝子と融合させ、適当な宿主細胞にトランスフェクトした後の改変遺伝子により生産されるｍＲＮＡおよび蛋白質のレベルを分析することによって、通常通りに試験する。改変遺伝子もしくは遺伝子断片を含むハイブリッド遺伝子により生産されるｍＲＮＡおよび蛋白質のレベルが、インジケーター遺伝子のみをコードするコントロールコンストラクトにより生産されるレベルとほぼ等しいならば、ＩＮＳに施された改変によって、阻害／不安定領域が遺伝子もしくは遺伝子断片から効果的に除かれたことを意味する。
本発明の方法において、３つ以上の点変異がＩＮＳ領域に導入されるだろう。所望により、点変異は阻害／不安定領域の少なくとも約１０％のヌクレオチドに導入されていもよい。これらの点変異は密集していてもよい。改変されるべきヌクレオチドは無作為に選択することができる（即ち、ＡＴもしくはＧＣ含量、または使用頻度の低い若しくは高いコドンの有無によって選択するのではない）が、唯一要求されるのは、該蛋白質によりコードされるアミノ酸配列が変わらないままであること；または、保存的もしくは非保存的アミノ酸置換がなされる場合、唯一要求されるのは変異遺伝子によりコードされる蛋白質が非変異遺伝子によりコードされる蛋白質と実質的に同様であることである。
本発明の方法において、遺伝暗号が縮重している、即ち多くのアミノ酸が複数のコドンに

よりコードされ得るという事実から、コードされる遺伝子が同じままであるように遺伝子配列を変異させることができる。セリンに対する塩基暗号は、例えば、コドンＴＣＴ、ＴＣＧ、ＴＣＣ、ＴＣＡ、ＡＧＴおよびＡＧＣ全てがセリンをコードするように、６重に縮重している。同様に、スレオニンはコドンＡＣＴ、ＡＣＡ、ＡＣＣおよびＡＣＧのいずれか一つによってコードされる。このように、複数の異なるＤＮＡ配列を利用して特定のアミノ酸の組をコードさせることができる。他のアミノ酸をコードするコドンとしては、フェニルアラニンにはＴＴＴおよびＴＴＣ；ロイシンにはＴＴＡ、ＴＴＧ、ＣＴＴ、ＣＴＣ、ＣＴＡおよびＣＴＧ；イソロイシンにはＡＴＴ、ＡＴＣおよびＡＴＡ；メチオニンにはＡＴＧ；バリンにはＧＴＴ、ＧＴＣ、ＧＴＡおよびＧＴＧ；プロリンにはＣＣＴ、ＣＣＣ、ＣＣＡおよびＣＣＧ；アラニンにはＧＣＵ、ＧＣＣ、ＧＣＡおよびＧＣＧ；チロシンにはＴＡＴおよびＴＡＣ；ヒスチジンにはＣＡＴおよびＣＡＣ；グルタミンにはＣＡＡおよびＣＡＧ；アスパラギンにはＡＡＴおよびＡＡＣ；リジンにはＡＡＡおよびＡＡＧ；アスパラギン酸にはＧＡＴおよびＧＡＣ；グルタミン酸にはＧＡＡおよびＧＡＧ；システインにはＴＧＴおよびＴＧＣ；トリプトファンにはＴＧＧ；アルギニンにはＣＧＴ、ＣＧＣ、ＣＧＡおよびＣＧＧ；並びにグリシンにはＧＧＵ、ＧＧＣ、ＧＧＡおよびＧＧＧがある。コドンを表した図表（即ち遺伝暗号）は、様々な一般の生物学もしくは生化学の教科書に見ることができる。

本発明の方法において、遺伝子の阻害／不安定領域をコードする部分がＡＴに富んでいる場合、阻害／不安定領域中の大部分もしくは全ての変異においてＡおよびＴがＧおよびＣヌクレオチドに置き換えられる、即ちＧＣにより富んだ領域にし、一方それでもなお該遺伝子のコード能を維持しておくようにすることが望ましいが、それが必要条件と考えられるわけではない。遺伝子の阻害／不安定領域をコードする部分がＧＣに富んでいる場合、阻害／不安定領域中の大部分もしくは全ての変異においてＧおよびＣヌクレオチドがＡおよびＴヌクレオチドに置き換えられる、即ちＧＣにあまり富まない領域にし、一方それでもなお該遺伝子のコード能を維持しておくようにすることが望ましいが、それが必要条件と考えられるわけではない。ＩＮＳ領域がＡＴもしくはＧＣに富んでいる場合、該領域が約５０％のＧＣ含量および約５０％のＡＴ含量を有するように改変されるのが最も望ましい。阻害／不安定領域若しくは領域群のＡＴ（即ちＡＵ）含量（あるいはまた、ＧＣ含量）は、そのような計算を行うように考案されたコンピュータープログラムを用いることにより計算することができる。本明細書中に例示される、ＨＩＶ－１　ｇａｇの阻害／不安定領域群のＡＴ豊富性を決定するのに使われた、そうしたプログラムの例は、ＶＡＸのＧＣＧ分析パッケージ（GCG Analysis Package）（ウィスコンシン大学）およびジーンワークパッケージ（Gene Works Package）（インテリジェネティックス）である。

本発明の方法において、ＩＮＳ領域が使用頻度の低いコドンを含む場合、それらのコドンをより使用頻度の高いコドンに改変することが望ましい。しかし、望むなら、（例えばＡＴ－リッチ領域をもっとＧＣ－リッチにするため）使用頻度の高いコドンをより使用頻度の低いものに改変してもよい。使用頻度の低い、もしくは殆ど使われないコドンをより使用頻度の高いコドンで置換することも望ましいが、それが必要条件と考えられるわけではない。所望により、最も使われないコドン（Ｔ．マルヤマら、Nucl.Acids Res.14（付録）:r151-197（1986）などにあるような既刊のコドン利用表から同定される）のみを使用頻度の高いコドンに置換してもよいし、あるいはまた、使用頻度の低いコドンの大部分もしくは全てを使用頻度の高いコドンに置換してもよい。一般的に、使用するのに好適なコドンの選択は、改変遺伝子が発現されるべき宿主細胞のコドン利用に依存する。しかし、より使用頻度の高いコドンからより使用頻度の低いコドンへの置換も、以下の実施例に示されるように、機能的であることを注目していただきたい。

先に注意したように、コード配列は遺伝暗号をもとに、そして好適には、本発明の変異遺伝子が発現されるべき宿主細胞もしくは生物における望ましいコドン利用をもとに選択される。多くのケースにおいて、特定の宿主もしくは発現系に好適なコドン利用は、利用可能な参考文献（例えば、Ｔ．マルヤマら、Nucl.Acids Res.14（付録）:r151-197（1986）を参照）から確かめることができ、または他の方法（例えば、1992年１月21日にＧ．Ｗ．

ハットフィールドらにより発行された、”Codon Pair Utilization”という名称の米国特許第５，０８２，７６７号（本明細書に参考事項として取り入れられている）を参照）によって確かめてもよい。最終的に生産される蛋白質量を増加させるために、ｍＲＮＡ安定性と同様に転写および翻訳を最適化するように配列を選択することが望ましい。コドン選択は、従って、例えば、宿主細胞の好適なコドン利用および／もしくは求める制限エンドヌクレアーゼ部位を提供する必要に応じてなされ、そして、コードされるｍＲＮＡ転写産物中の潜在的な二次構造規制を避ける必要に応じても選択がなされる場合がある。潜在的な二次構造規制は、Ｍ．ズッカーら、Nucl.Acids Res. 9:133（1981）に記載されたようなコンピュータープログラムを利用することによって同定することができる。選択された宿主細胞もしくは生物における最適コドン利用に関してコドンの使用頻度が不明もしくは曖昧である状況では、複数のコード配列を選択することができる。しかし、いずれのコドンの正しい組も、最適効率以下で翻訳されるとしても、求める蛋白質をコードすることに変わりはない。

本発明の方法において、ＩＮＳ領域が保存されたヌクレオチドを含む場合、阻害／不安定領域中の保存ヌクレオチド配列を変異させることも望ましいが、それが必要条件と考えられるわけではない。所望により、阻害／不安定領域中になされる変異の最低約７５％が、保存ヌクレオチドの変異を伴うこともある。保存ヌクレオチドは、当該分野の実践者に利用可能な様々なコンピュータープログラムを用いることにより決定することができる。

本発明の方法において、コードされるアミノ酸が１つ若しくは複数の保存もしくは非保存アミノ酸を含むように変えられるが、それでも機能的に等価な蛋白質を提供するように、阻害／不安定配列を変異させることが可能であることも予想される。例えば、該配列内の１つもしくは複数のアミノ酸残基を類似の極性を持つ別のアミノ酸（機能的に等価に働く）で置換し、アミノ酸配列において中立的な置換をもたらすようにすることができる。該配列内のアミノ酸に対する置換基は、該アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれる。正電荷を持つ（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが含まれる。負電荷を持つ（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。

例示の本発明の方法において、約３００ヌクレオチドの領域に渡る４つの異なるオリゴヌクレオチドでのクラスター部位特異的変異導入を用いて、安定なｍＲＮＡをコードするコンストラクトｐ１７Ｍ１２３４（下記）を作製することにより、阻害／不安定活性を持つと思われるＨＩＶ－１　ｇａｇ遺伝子中の全ての領域を、先ず、約２７０ヌクレオチドの長さの部分全体を一度に変異させた。

４つのオリゴヌクレオチド（図４に示されている）は、

Ｍ１：ccaggggaaagaagaagtacaagctaaagcacatcgtatgggcaagcagg (SEQ ID NO:6);

Ｍ２：ccttcagacaggatcagaggagcttcgatcactatacaacacagtagc (SEQ ID NO:7);

Ｍ３：accctctattgtgtgcaccagcggatcgagatcaaggacaccaaggaagc (SEQ ID NO:8);

および

Ｍ４：gagcaaaacaagtccaagaagaaggcccagcaggcagcagctgacacagg (SEQ ID NO:9)

である。これらのオリゴヌクレオチドは、５１（Ｍ１）、４８（Ｍ２）、５０（Ｍ３）および５０（Ｍ４）ヌクレオチドの長さである。各オリゴヌクレオチドは、１９－２２ヌクレオチドの部分に渡り、いくつかの点変異を導入した（下記参照）。最初の変異ヌクレオチドの５′側にあるヌクレオチド数は、１４（Ｍ１）、１８（Ｍ２）、１７（Ｍ３）およ

び１１（Ｍ４）であり；最後の変異ヌクレオチドの３′側にあるヌクレオチド数は、１５（Ｍ１）、８（Ｍ２）、１４（Ｍ３）および１７（Ｍ４）である。これらの領域の各々に変異前にあったＡＴ／ＧＣヌクレオチド比は、３３ＡＴ／１８ＧＣ（Ｍ１）、３０ＡＴ／１８ＧＣ（Ｍ２）、２９ＡＴ／２１ＧＣ（Ｍ３）および２７ＡＴ／２３ＧＣ（Ｍ４）であった。これらの領域の各々に変異後にあったＡＴ／ＧＣヌクレオチド比は、２５ＡＴ／２６ＧＣ（Ｍ１）、２４ＡＴ／２４ＧＣ（Ｍ２）、２３ＡＴ／２７ＧＣ（Ｍ３）および２２ＡＴ／２８ＧＣ（Ｍ４）であった。合計２６コドンが変えられた。該コドンがヒト遺伝子１０００コドンあたりに出現する回数は（Ｔ．マルヤマら、Nucl.Acids Res.14（付録）：r151-197（1986）から）、コドンの隣の括弧に挙げられている。例えば、リジン（Lys）をコードする８コドンはａａａ（２２．０）からａａｇ（３５．８）に；チロシン（Tyr）をコードする２コドンはｔａｔ（１２．４）からｔａｃ（１８．４）に；ロイシン（Leu）をコードする２コドンはｔｔａ（５．９）からｃｔａ（６．１）に；ヒスチジン（His）をコードする２コドンはｃａｔ（９．８）からｃａｃ（１４．３）に；イソロイシン（Ile）をコードする３コドンはａｔａ（５．１）からａｔｃ（２４．０）に；グルタミン酸（Glu）をコードする２コドンはｇａａ（２６．８）からｇａｇ（４１．６）に；アルギニン（Arg）をコードする１コドンはａｇａ（１０．８）からｃｇａ（５．２）に、およびアルギニン（Arg）をコードする１コドンはａｇｇ（１１．４）からｃｇｇ（７．７）に；アスパラギン（Asn）をコードする１コドンはａａｔ（１６．９）からａａｃ（２３．６）に；グルタミン（Gln）をコードする２コドンはｃａａ（１１．５）からｃａｇ（３２．７）に；セリン（Ser）をコードする１コドンはａｇｔ（８．７）からｔｃｃ（１８．７）に；そしてアラニン（Ala）をコードする１コドンはｇｃａ（１２．７）からｇｃｃ（２９．８）に変えられた。

ＤＮＡ分子の構造もしくは配列の改変を起こすのに使われる、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異導入の技術は、当該分野の知識を有するものに知られている。変異させるべき標的ＤＮＡ配列は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡもしくは合成ＤＮＡ配列でもよい。一般的に、これらのＤＮＡ配列を適当なベクター、例えば、バクテリオファージＭ１３ベクターにクローン化し、組み換えバクテリオファージにより生じたプラークから１本鎖鋳型ＤＮＡを調製する。１本鎖ＤＮＡを合成オリゴヌクレオチドにアニールさせ、変異導入および以降の工程を当該分野でよく知られた方法により遂行する。例えば、Ｍ．スミス（Smith）とＳ．ギルアム（Gillam）、Genetic Engineering: Principles and Methods,Plenum Press 3:1-32（1981）（レビュー）およびＴ．クンケル（Kunkel）、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492（1985）を参照していただきたい。また、サムブルックら、（1989）（上記）も参照していただきたい。合成オリゴヌクレオチドはＤＮＡ合成機（例、アプライドバイオシステムズ；Applied Biosystems）で合成でき、当該分野で知られている方法により電気泳動により精製できる。本方法に使われる選択された若しくは調製されたオリゴヌクレオチドの長さは、様々に変えることができる。絶対的なサイズ制限は存在しない。都合の良さから言えば、本発明のプロセスに利用されるにあたっては、オリゴヌクレオチドの最も短い長さは一般的には約２０ヌクレオチドで、最も長いものの長さは一般的には約６０から１００ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドプライマーのサイズは、変異が導入されるべき遺伝子の領域へのプライマーの安定なハイブリダイゼーションに対する必要性、およびオリゴヌクレオチドの合成に関して現在利用可能な方法の限界によって決定される。オリゴヌクレオチドによる変異導入に使われるオリゴヌクレオチドを設計するのに考慮される因子（例えば、全体のサイズ、変異の隣接部のサイズ）は、Ｍ．スミスとＳ．ギルアム、Genetic Engineering: Principles and Methods,Plenum Press 3:1-32（1981）に記載されている。一般的に、オリゴヌクレオチドの全体の長さは、変異部位での安定かつユニークなハイブリダイゼーションを最適化するよう、変異部位から５′および３′側の余剰部分がＤＮＡポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性による変異の修正がなされないほど十分なサイズを持つようになっているだろう。本発明の変異導入に使われるオリゴヌクレオチドは、少なくとも約２０ヌクレオチド、通常約４０から６０ヌクレオチドの長さであることが一般的であり、長さにして約１００ヌクレオチドを超えないのが普

通であろう。オリゴヌクレオチドは改変されるコドンの３′側に最低約５塩基を含むのが普通であろう。
本発明の好適な変異導入プロトコールにおいて、ＩＮＳを含む発現ベクターには骨組みとしてＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴプラスミドベクターが含まれる。これにより、１本鎖ＤＮＡの他に２本鎖も調製が可能となる。ウラシルを含む１本鎖ＤＮＡは以下の標準プロトコールに従って調製される：該プラスミドをＦ′細菌株（例、ＤＨ５αＦ′）に形質転換する。コロニーを繁殖させ、ヘルパーファージＭ１３－ＶＣＳ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　＃２００２５；1×10^{11} pfu/ml）に感染させる。このファージを用いて大腸菌株ＣＪ２３６の培養物に感染させ、標準的な方法に従って１本鎖ＤＮＡを分離する。０．２５ｕｇの１本鎖ＤＮＡを合成オリゴヌクレオチド（各オリゴは５　OD_{260}／ｍｌの濃度に溶解させ、５ｕｌを用いる）とアニールさせる。合成オリゴヌクレオチドは普通、約４０から６０ヌクレオチドの長さで、５′および３′の各末端に約１０ヌクレオチドの完全な塩基マッチを含むように設計される。それらは残りの２０－４０ヌクレオチドの中に求めるだけの数の変更を含むことができる。オリゴヌクレオチドは、問題の領域をカバーするよう設計され、それらは互いに隣り合っていてもよいし、またはそれらの間にギャップがあってもよい。１度に６つまで異なるオリゴヌクレオチドが使われたことがあるが、同時に６つ以上のオリゴヌクレオチドを使用することも本発明の方法で実行され得ることが考えられる。アニーリングの後、Ｔ４ポリメラーゼによる伸長反応により、ウラシルを含まない第２鎖が作られる。遊離末端はリガーゼにより連結する。これにより、大腸菌株ＨＢ１０１に形質転換するのに使うことのできる２本鎖ＤＮＡが生じる。ウラシルを含まない変異鎖が２本鎖ＤＮＡを生産し、これに導入された変異が含まれる。個々のコロニーを取り、配列解析により変異を素早く証明する。別の方法として若しくはさらに、異なる変異表現型を生じる異なるオリゴヌクレオチドの組み合わせに関する選択に対して、この変異導入法を用いることができる（実際、用いられた）。これにより、機能に重要な領域の解析が容易になり、ＩＮＳに関与する正確な配列解析が可能となるので、以下の実験の手助けとなる。本明細書中に記載されたＨＩＶ－１のＩＮＳ－１領域の例示された変異導入に加え、本発明は、並んで編成された３つのオリゴヌクレオチド（合計３５の変異を導入する）を用いて、一工程で１５０ヌクレオチドの領域を変異させるのにも用いられている。変更の上限は明確ではないが、およそ５００ヌクレオチドの領域を、本プロトコールを用いて一工程でその２０％のヌクレオチドを変更することができると計算されている。
オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異導入を用いることにより変異させる例示された方法は、当該分野で知られた他の方法を用いることにより変化させることができる。例えば、重なり合う合成デオキシヌクレオチドを直接用いて（例えば、エッジ（Edge）ら、Nature 292:756（1981）；ナンベア（Nambair）ら、Science 223:1299（1984）；ジェイ（Jay）ら、J.Biol.Chem.259:6311（1984）；またはポリメラーゼ連鎖反応で作製されたＤＮＡもしくはｃＤＮＡおよび合成オリゴヌクレオチドを組み合わせて用いることにより、変異遺伝子を合成することができる
４．変異ｍＲＮＡの安定性の決定
得られた変異ｍＲＮＡの定常状態レベルおよび／もしくは安定性を、阻害／不安定領域を含む非改変ｍＲＮＡの定常状態レベルおよび／もしくは安定性を試験するのと同様にして（上記第１章に考察されているように、例えばノザンブロッティングにより）、試験することができる。阻害／不安定領域（群）を含む非改変ｍＲＮＡおよび望みによっては非改変インジケーターｍＲＮＡと共に（従ってこれらと比較して）、変異ｍＲＮＡを解析することができる。例示されるように、トランスフェクション実験において、ノザンブロット分析によって以降のｍＲＮＡ解析を行うことにより、ＨＩＶ－１　ｐ１７ｇａｇ変異体を非変異ＨＩＶ－１　ｐ１７ｇａｇと比較する。これらのｍＲＮＡにより生産される蛋白質は、ＥＬＩＳＡなど、当該分野で知られた免疫ブロッティングおよび他の方法によって測定する。下記参照。
ＶＩ．工業的応用性
本発明の方法により変異導入が可能な遺伝子には、そのｍＲＮＡがその中にＩＮＳ領域を

含むことが知られている、若しくは含むと思われるものが含まれている。これらの遺伝子には、例えば、増殖因子、インターフェロン、インターロイキン、ｆｏｓ原癌遺伝子蛋白質、並びに、本明細書中に例示されたものに加え、他のウイルスｍＲＮＡ以外に、ＨＩＶ－１　ｇａｇ、ｅｎｖおよびｐｏｌをコードする遺伝子が含まれる。本発明の方法により変異導入される遺伝子は、天然の宿主細胞もしくは生物、または異なる細胞若しくは生物において発現させることができる。変異遺伝子は、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスもしくはミニ染色体などのベクターに導入することができ、当該分野でよく知られた方法により宿主細胞もしくは生物に挿入することができる。一般的に、変異遺伝子もしくはこれらの変異遺伝子を含むコンストラクトは、哺乳動物細胞（例、ヒト（例、ＨｅＬａ）、サル（例、Ｃｏｓ）、ウサギ（例、ウサギ赤血球）、ラット、ハムスター（例、ＣＨＯおよびベビーハムスター腎細胞）もしくはマウス細胞（例、Ｌ細胞））、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞または細菌細胞（例、大腸菌）を含め、真核細胞または原核細胞のいずれの細胞にも利用することができる。これらの変異遺伝子のクローン化および／もしくは発現に利用することのできるベクターは、該変異遺伝子が複製され、そして／もしくは発現されて欲しい宿主細胞において、変異遺伝子を複製および／もしくは発現させる能力を持つベクターである。様々なタイプの宿主細胞に適したベクターの例としては、例えば、Ｆ．アウスベル（Ausbel）ら、Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience（1992）およびサムブルックら（1989）を参照していただきたい。そのような遺伝子の本来のプロモーターを、該遺伝子が挿入される宿主と両立し得る強力なプロモーターに置き換えることができる。これらのプロモーターは誘導性であってもよい。これらの変異遺伝子を含む宿主細胞を用いて、酵素調製品、医薬品、診断薬、ワクチンおよび治療学に有用な蛋白質を大量に発現させることができる。本発明の方法により改変された遺伝子もしくは該遺伝子を含むコンストラクトはｉｎ　ｖｉｖｏもしくはｉｎ　ｖｉｔｒｏ遺伝子置換に利用することもできる。例えば、阻害／不安定領域を有するｍＲＮＡを生産する遺伝子を、本発明の方法により改変された遺伝子にそのまま（in situ）置き換えて、最終的に発現される生産量を増加させることができる。そのような遺伝子にはウイルス遺伝子および／もしくは細胞性遺伝子が含まれる。そのような遺伝子置換は、例えば、ワクチンおよび／もしくは遺伝子治療の開発に有用であろう。

例示された改変ｇａｇ、ｅｎｖおよびｐｏｌ遺伝子をコードするコンストラクトを用いることにより作られたコンストラクトおよび／もしくは蛋白質は、例えば、ＡＩＤＳおよびＡＩＤＳ関連疾患に対する診断薬、ワクチンおよび治療薬の生産に利用することができよう。例示されたＨＩＶ－１　ｇａｇ遺伝子中の阻害／不安定エレメントは、宿主における低レベルなウイルス生産状態の確立にも関与し得る。ＨＩＶ－１および他のレンチウイルス（lentivirus）は、免疫系により一掃されない慢性的な能動感染を引き起こす。レンチウイルスゲノムから阻害／不安定配列エレメントを完全に除くことにより、構成的な発現がもたらされるであろう。これにより、ウイルスが潜伏感染を確立し免疫系の監視を逃れるのを防ぐことができる。阻害配列エレメントの排除によりｐ１７ｇａｇの発現増加に成功することは、いかなるネガティブエレメントも持たないレンチウイルスを生産することができることを示唆する。そのようなレンチウイルスは、弱毒化されたワクチンに対する新規のアプローチ法を提供し得るだろう。

例えば、高レベルのＧａｇを発現するベクターは、ヒトで発現させた後の免疫療法および免疫予防に使用することができる。そのようなベクターはレトロウイルスベクターを含み、並びに、例えば、ウォルフら、Science 247:1465-1468（1990）、ウォルフら、Human Molecular Genetics 1（6）:363-369（1992）およびウルマー（Ulmer）ら、Science 259:1745-1749（1993）に記載された技術を用いた、ＤＮＡの筋細胞もしくは他の受容細胞への直接的な注入（ｇａｇの効率的な発現をもたらす）も含む。さらに、ｇａｇコンストラクトは、ヒトに導入された後のトランス優性なＨＩＶ発現阻害に利用することもできよう。本出願に関して、例えば、高レベルのｐ５５ｇａｇもしくはｐ３７ｇａｇを発現する適当なベクターもしくはＤＮＡ分子を改変して、例えば、ツロノ（Trono）ら、Cell 59:113-1

20（1989）に記載されているような、トランス優性なｇａｇ変異体が作製されるだろう。該ベクターはヒトに導入され、ｇａｇトランス優性阻害および生産されたｇａｇ蛋白質による免疫刺激を組み合わせた機構によって、ＨＩＶ産生の阻害をもたらすだろう。加えて、本発明のｇａｇコンストラクトは、レンチウイルスｇａｇ蛋白質の発現に基づいた、新しいレトロウイルスベクターの作製に利用できよう。レンチウイルスは、分裂していない細胞を標的とし、効率よく感染することができるという独特の性質を持つ。高レベルのｅｎｖを発現するベクターに関して、同様の応用が予想される。

ＳＩＶ中の同様の阻害／不安定エレメントの同定は、このウイルスがこれらの仮説の検証に便利なモデルを提供し得ることを示唆する。

例示されたコンストラクトはまた、阻害／不安定領域を含むことが知られている、もしくはそう思われるいかなるｍＲＮＡ、例えば、本明細書中に例示されたものに加え他のウイルスｍＲＮＡ並びに、様々な増殖因子、インターフェロンもしくはインターロイキンをコードするｍＲＮＡにおいて、該配列の境界を簡単かつ迅速に検出および／もしくは更に規定するのにも利用することができる。

以下の実施例は本発明のある態様を例示するが、しかし、いかなる点においても本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。ある種の改変および多様性は、以前の開示からの教訓および以下の実施例より当該分野の知識を有するものには明らかであろう。そしてこれらは、本発明の精神および範囲内にあるものと意図される。

実施例1

HIV-1 GAG遺伝子

ヒト免疫不全症候群ウイルス1型（HIV-1）のRev制御タンパク質と、Rev-応答エレメント（RRE）と命名されたそのRNA標的との相互作用は、ウイルス構造タンパク質の発現に必要である（レビューとしてG.パブラキスとB.フェルバー（G. Pavlakis and B. Felber）New Biol. 2:20-31（1990）；B.キュレンとW.グリーン（B. Cullen and W. Greene）Cell 58:423-426（1989）；C.ローゼンとG.パブラキス（C. Rosen and G. Pavlakis）AIDS J. 4:499-509（1990）を参照）。RevはRREを含むmRNAの核からの移行を促進し、その安定性を増加させることによって作用する。最近の結果ではREVがこれらのmRNAのポリソームへの効率的な会合に役割を果たすことも示されている（S.アリゴとI.チェン（S. Arrigo and I. Chen）Gene Dev. 5:808-819（1991），D. ダゴスティーノら（D. D'Agostino et al.）Mol. Cell Biol.12:1375-1386（1992））。RREを含んだHIV-1のmRNAは、Revの非存在下ではタンパク質を効率良く産生できないことから、これらのmRNAには欠損があり、INS，CRS，またはIRと様々な表記がされている阻害/不安定配列が含まれていると予想されていた（M.エマーマンら（M. Emerman et al.）Cell 57: 1155-1165（1989）;S. シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol.66: 150-159（1992）；C.ローゼンら（C. Rosen et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2071-2075（1988）；M. ハッツポロークラダラスら（M. Hadzopoulou-Cladaras et al.）J. Virol. 63:1265-1274（1989）；F.マルダレリら（F. Maldarelli et al.）J. Virol.65: 5732-5743（1989）；A.W.コクランら（A. W. Cochrane et al.）J. Virol. 65: 5305-5313（1991））。これらの阻害/不安定配列の性質と機能に関して、詳細な記述はなされていない。不要のスプライス部位がRevの機能に必要ではないかと予想されており（D.チャンとP.シャープ（D. Chang and P. Sharp）Cell 59:789-795（1989））、こうしたスプライス部位の存在が、HIV-1 mRNAをRev依存性としているのかもしれない。

HIV-1のハイブリッド構築の解析から、HIV-1のgagおよびpol領域内のある種の阻害/不安定配列について最初の記述がなされた（S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol.66:150-159（1992）；F.マルダレリら（F. Maldarelliet al.）J. Virol. 65:5732-5743（1991）；A.W.コクランら（A. W. Cochrane etal.）J. Virol. 65:5305-5313（1991））。HIV-1のp17^{gag}マトリックスタンパク質のコーディング領域に位置する阻害/不安定性RNAエレメントの同定についても、報告がなされている（S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol. 66:150-159（1992））。この配列をtat cDNAに挿入すると、cisに作用してHIV-1のtatの発現を阻害することが示されている。この阻害がRev-RREで抑えられるこ

とは、このエレメントがRevによる制御において役割を果たしていることを示している。

1．p17^{gag}発現プラスミド

p17^{gag}中の阻害/不安定性エレメントをさらに研究するため、p17^{gag}発現プラスミド（p17図1）を構築した。p17^{gag}配列はコーディング配列の直後に翻訳終止コドンを含むように設計し、そうしてp17^{gag}だけを産生するようにした（このプラスミドの構築は後に記載する）。HIV-1上のgag AUGの上流にある主要な5’スプライス部位は、このベクターから欠失してある（B.フェルバーら（B. Felber et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1495-1499（1989））。p17プラスミドがRevとRREの非存在下でp17^{gag}を産生できるかどうかを調べるため、p17をHLtat細胞に導入した（S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol. 64:2519-2529（1990））（以下参照）。これらの細胞はHIV-1 LTRプロモーターのtransの活性化に必要な、HIV-1 Tatタンパク質を構成的に産生する。p17プラスミドをRevの非存在下または存在下で導入し、p17^{gag}の産生をウェスタン免疫ブロッティングにより解析した。その結果、非常に低いレベルのp17^{gag}タンパク質が産生されていることがわかった（図2A）。gag mRNAにはRREが含まれないことから予想されるとおり、Revの存在はgagの発現を増加させなかった。次にp17^{gag}コーディング配列とRREの両者を含むプラスミド（p17R　図1）を構築した。p17と同様にこのプラスミドは、Revの非存在下で非常に低いレベルのp17^{gag}を産生した。だが高レベルのp17^{gag}が、Revの存在下でのみ産生された（図2A）。これらの実験は、阻害/不安定性エレメントがp17^{gag}コーディング配列の中に位置することを示唆した。

様々な真核生物ベクターを用いた発現実験は、いくつかの他のレトロウイルスでは、こうした阻害/不安定配列がそのコーディング配列中に含まれないことを示している（たとえばJ.ウィルスら（J. Wills et al.）J. Virol. 63:4331-43（1989）；V.モリスら（V. Morris et al.）J. Virol. 62:349-53（1988））。こうした結果を確かめるため、p17プラスミド上のHIV-1のp17^{gag}（マトリックス）遺伝子を、ラウス肉腫ウイルス（RSV、SR-A系統）の相同タンパク質であるp19^{gag}（マトリックス）のコーディング配列と置換した。得られたプラスミドであるp19（図1）は、gagコーディング配列以外p17プラスミドと同一であった。p19プラスミドからのp19^{gag}の産生をウェスタン免疫ブロッティングにより解析した結果、このプラスミドは高レベルのp19^{gag}タンパク質を産生することがわかった（図2A）。これらの実験は、RSVのp19^{gag}コーディング配列がHIV-1のp17^{gag}とは対照的にこのベクターで効率良く発現されることを明らかにし、RSVのgag領域が阻害/不安定性エレメントを含まないことを示している。p19プラスミドの誘導体としてRREを含むものも構築し、p19Rと命名した（図1）。興味深いことにRevの非存在下では、RREを含むプラスミドp19Rからは非常に低レベルのp19^{gag}タンパク質しか産生されなかった。この観察結果は、導入したRREと3’HIV-1配列が働いてp19Rプラスミドからのp19^{gag}の発現に阻害的な効果を及ぼすことを示すものであり、Revの非存在下でRREを含むウイルスの3’末端のより長い領域が、阻害/不安定性エレメントとして作用することを示した最近のデータと一致する（G.ナシオラス、G.パブラキス、B.フェルバー（G. Nasioulas, G. Pavlakis, B. Felber）論文準備中）。結論として、同じベクターでRSV p19^{gag}の高レベルでの発現が見られたことは、HIV-1 p17^{gag}コ　ディング領域内の阻害/不安定配列が極めて低レベルでの発現の要因であるという結果を支持していると言える。

次にp17^{gag}のコーディング配列の阻害/不安定性効果が、mRNAのレベルでも検出されるかどうかを決定した。p17で形質転換した、またはp17Rで形質転換したHLtat細胞から抽出したRNAのノザンブロット解析の結果、p17RからはRevの非存在下ではより低いmRNAレベルしか産生されないことが明らかとなった（図3A）（実施例3参照）。Revの共発現後には、p17RのmRNAレベルは2から8倍の増加が観察された。p17プラスミドの産生するmRNAレベルは、Revの非存在下でp17Rから産生されるmRNAレベルと同じであった。特にRevはRREを含まないmRNAと、そうしたmRNAから産生されるタンパク質のレベルを減少させた。共発現実験におけるRevのこうした阻害効果は、ルシフェラーゼやCATといった他のRREを含まないmRNAについても観察されている（L.ソロミンら（L. Solomin et al.）J. Virol. 64:6010-6017（1990）;D.M. ベンコら（D. M. Benko et al.）New Biol 2:1111-1122（1990））。こ

れらの結果はgagの中の阻害エレメントがmRNAレベルにも影響を及ぼすことを確定したものであり、先の知見と一致するものである（S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol. 66:150-159（1992））。Revの非存在下または存在下でのp17Rから産生されるmRNAレベルとタンパク質レベルの定量を、試料を適当に段階希釈して走査型密度測定装置を用いて行い、その結果相違はmRNAレベル（2から8倍）よりもタンパク質のレベル（60から100倍）で顕著であることが示された。この結果はgagとenvの両mRNAの局在とポリソームへの取り込みにRevが及ぼす効果に関する先の知見と矛盾しない。（S. アリゴら（S. Arrigo）Gene Dev. 5:808-819（1991）；D. ダゴスティーノら（D. D'Agostino et al.）Mol. Cell Biol. 12:1375-1386（1992）；M.エマーマンら（M. Emerman et al.）Cell 57:1155-1165（1989）；B.フェルバーら（B. Felber et al.）Proc. Natl.Acad. Sci. USA 86:1495-1499（1989）；M. マリムら（M. Malim et al.）Nature（London）338:254-257（1989））。RSV gag発現プラスミドから産生されるmRNAのノザンブロット解析の結果、p19は高レベルのmRNAを産生することがわかった（図3B）。この結果はさらに、RSVのp19^{gag}コーディング配列が阻害エレメントを含まないことを示している。p19RプラスミドにはRREと3'HIV-1配列が存在する結果、Revの非存在下でmRNAのレベルが低下しているが、このことはこの配列中に阻害エレメントが存在することを示唆する。以上を考えあわせればこれらの結果は、HIV-1のgagの発現はRSVの場合と根本的に異なるということを証明している。RSVのp19^{gag}コーディング配列が阻害配列を含まないのに対し、HIV-1のp17^{gag}コーディング配列は強い阻害エレメントを含んでいる。興味深いことにプラスミドp19はRSV env mRNAの生成に用いられる5'スプライス部位を含み、これはgag AUGの下流に位置する。この5'スプライス部位は、記載された発現ベクターでは利用されていない（図3B）。この5'スプライス部位の不可変のGTジヌクレオチドをATに変異させても、p19^{gag}の発現に顕著な影響を与えなかった（データは示していない）。一方、HIV-1 p17発現プラスミドは既知のスプライス部位は含んでいないが、Revの非存在下で発現されない。これらの結果はさらに、不要のスプライス部位以外の配列が、gagの発現阻害の要因であることを示している。

2. 変異を導入したp17^{gag}ベクター

HIV-1 gag中の阻害配列の正確な性質を調べるため、図4に示すように４種の異なるオリゴヌクレオチドを用いて、p17^{gag}のコーディング配列に部位特異的変異導入を行った。それぞれのオリゴヌクレオチドは、19から22ヌクレオチドの範囲に数箇所の点突然変異を導入した。これらの変異は沈黙コドン変化（silent codon changes）を導入するので、p17^{gag}タンパク質のアミノ酸配列には影響しなかった。最初に４種のオリゴヌクレオチドを同時に用いて、記載のとおり一本鎖DNAを鋳型とした変異導入を行った（T.クンケル（T. Kunkel）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492（1985）；S. シュワルツら（S. Schwartz et al.）Mol. Cell. Biol. 12:207-219（1992））。この結果p17ベクター中の270ヌクレオチドの広い領域にわたって、多数の点変異を同時に導入することができた。４種のオリゴヌクレオチド全ての変異を含んだ変異体を単離し、p17M1234と命名した。p17と比較した場合、このプラスミドは高いAU含有率の領域に特に集中する、総数28個の点変異を含んでいる。HLtat細胞に形質転換させた後、p17^{gag}の発現を免疫ブロッティングで解析することにより変異の表現型を評価した。興味深いことにp17M1234は高レベルのp17^{gag}タンパク質を産生し、そのレベルはRevの存在下でp17Rが産生する場合よりも高かった（図2A）。この結果はプラスミドp17M1234ではp17^{gag}mRNAの阻害/不安定性シグナルが不活化されているがことを示している。予想されたとおり、Revタンパク質の存在はp17M1234からの発現を増加させず、gagの発現にわずかに阻害効果を及ぼした。このようにp17M1234変異からのp17^{gag}の発現は、RSVのp19^{gag}と同じ一般的特性、すなわちRevに依存しない高い構成的レベルのgagの発現を示した。ノザンブロット解析の結果、p17M1234から産生されるmRNAのレベルは、p17から産生される場合に比べて増大していることが明らかとなった（図3A）。

最小の阻害/不安定配列の性質と正確な局在をさらに調べるために、p17プラスミド内のp17^{gag}コーディング配列への変異導入を、４種の変異オリゴヌクレオチドのうちの1つだけ

を用いて行った。この実験操作の結果４種の変異プラスミドが作られ、それぞれが含むオリゴヌクレオチドによりp17M1,p17M2,p17M3,p17M4と命名した。これらの変異体のいずれもp17プラスミドと比較して、顕著に高いレベルのp17^{gag}タンパク質を産生することはなく（図5）、阻害/不安定性エレメントには影響がないことが示された。次にp17コーディング配列に同時に2種のオリゴヌクレオチドで変異を導入した。この結果得られた変異体をp17M12，p17M13，p17M14，p17M23，p17M24，p17M34と命名した。これらの変異体からのタンパク質産生はp17からの場合に比べて僅かに増大したが、p17M1234からの場合よりもかなり低かった（図5）。また3つのオリゴヌクレオチドを用いた変異であるp17M123も、高レベルのp17^{gag}を発現することはなかった（データは示していない）。これらの知見はp17^{gag}のコーディング配列に、複合的な阻害/不安定性シグナルが存在することを示唆するのかもしれない。あるいは単一の阻害/不安定性エレメントが広い領域に広がっていて、その不活化には2種以上のオリゴヌクレオチドでの変異導入が必要なのかもしれない。この可能性はp17^{gag}コーディング配列中の218ヌクレオチドの阻害/不安定性エレメントがgagの発現の強い阻害に必要であるとする先のデータと矛盾しない。この配列をさらに欠失させると徐々に阻害効果が失われる（S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol. 66:150-159（1992））。阻害/不安定性エレメントはmRNA上の特異的な二次構造と一致するのかもしれない。現在特異的な構造が阻害/不安定性エレメントの機能に重要なのかどうかを調べている。

p17^{gag}コーディング配列は、RSVのp19^{gag}コーディング配列と異なり、高い含有率でAおよびUヌクレオチドを含む（S.シュワルツら（S. Schwartzet al.）J. Virol. 66:150-159（1992）；G.マイヤースとG.パブラキス（G. Myers and G. Pavlakis）J.レビー（J.Levy）編集 The Retroviridae所収（Plenum Press, New York, NY, 1992）1-37頁）。p17^{gag}コーディング配列には4つの高いAU含有率の領域が存在し、gagの発現阻害に関与している（S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol. 66:150-159（1992））。レンチウイルスは哺乳類のゲノムに比べて、高いAU含有率を持つ。多様にスプライスされるmRNAが低いAU含有率を持つのに対し、高いAU含有率の領域がgag/polおよびenv領域に見出されること（G.マイヤースとG.パブラキス（G. Myers and G. Pavlakis）J.レビー（J.Levy）編集 The Retroviridae所収（Plenum Press, New York,NY, 1992）1-37頁））は、阻害/不安定性エレメントが高いAU含有率のmRNA領域と関連しているという可能性を支持している。特異的なオリゴヌクレオチド配列であるAUUUAは、いくつかの不安定なmRNAのAUに富んだ3’非翻訳領域に見出されるが、この配列がRNAを不安定化させることが示されている（G.シャーとR.カメン（G. Shaw and R. Kamen）Cell 46:659-667（1986））。この配列はp17^{gag}配列中には存在しないが、gag/polおよびenv領域内に多コピーで見出されている。しかし我々のベクターで強い阻害/不安定性活性を示したRREと3’HIV配列はAUに富んでいないので、不安定配列とAUに富んだ領域との関連は普遍的なものとはいえない。これらの観察結果は2種以上の型の阻害/不安定配列が存在することを示唆する。AU含有率を減少させるのに加えて、p17プラスミドにいくつか変異を導入して、ヒト細胞で使用頻度の低いコドンをより頻度の高いコドンに変化させた。頻度の低いコドンの使用は、HIV gagの低い発現のもう一つの説明になるが、Revの存在によりgagの発現の欠損が是正されるので、これらの結果からこうした型の翻訳制御は考えにくい。さらに非翻訳配列の存在がgagの発現を減少させた観察結果（たとえばp17R上のRRE配列）は、阻害/不安定性領域の翻訳が阻害に必要ではないことを示唆している。p17M1234へのRREと3’HIV配列の導入によりgagの発現を減少させることが可能であり、翻訳と共役して作用するのではない独立した負の因子が、発現の低下の要因となっていることが確められた。

3．gag遺伝子のp24とp15領域の付加的なINS配列の同定と欠失

p17^{gag}コーディング領域内のINS（p17^{gag}コーディング領域は図1（B）上の記載に記されているとおりヌクレオチド336-731に広がり、図1（A）と（B）に示すとおりgagコーディング領域の3つの部分（すなわちp17，p24，p15）のうち最初の部分を含む）の除去が完全なgag遺伝子の発現に与える影響を調べるため、ベクターp17M1234上の、変異により変化させたp17^{gag}コーディング領域の3’側すなわち終止コドンの下流にgag遺伝子の付加的な

配列を挿入した発現ベクターを構築した。gagの配列を徐々に伸ばした長さで含んだベクター、すなわち図1（C）に示したp17M1234（731-1081），p17M1234（731-1424），p17M1234（731-2165）の解析を行った。$p17^{gag}$の発現レベルを測定した結果、gagタンパク質の２番目の部分をコードするmRNA領域（すなわち731-1424ヌクレオチドに広がる$p24^{gag}$タンパク質をコードする部分）が弱いINSのみを含むことが、p17M1234により発現される$p17^{gag}$タンパク質量がp17M1234（731-1424）により発現される$p17^{gag}$タンパク質量と比較して少し減少していることから決定されたのに対し、gagタンパク質の3番目の部分をコードするmRNA領域（すなわちヌクレオチド1425-2165に広がる$p15^{gag}$タンパク質をコードする部分）が強いINSを含むことが、p17M1234（731-2165）により発現されるgagタンパク質量がp17M1234とp17M1234（731-1424）により発現されるタンパク質量と比較し大きく減少していることから決定された。

4．p37M1234ベクター

上記の解析により、高レベルの$p37^{gag}$前駆タンパク質（$p17^{gag}$と$p24^{gag}$タンパク質領域の両方を含む）を発現するp37M1234ベクターの構築が可能となった。ベクターp37M1234の構築は、変化させた$p17^{gag}$タンパク質をコードする遺伝子の末端の停止コドンを除去し、$p24^{gag}$タンパク質をコードするヌクレオチド配列をオリゴヌクレオチド変異導入で正しい読み枠に融合して行った。これによりヌクレオチド配列が回復され、HIV-1にコードされていた時と同様に、融合した$p17^{gag}$と$p24^{gag}$タンパク質（すなわち$p37^{gag}$タンパク質）をコードするようになった。$p37^{gag}$または$p24^{gag}$タンパク質の存在は、商業的に入手可能なＥＬＩＳＡキットにより容易に定量可能なので、ベクターp37M1234を用いればINSを含むと疑われる付加的な配列を挿入し検定することができる。そうした用法の実施例を以下に示す。

5．p17M1234（731-1081）NSおよびp55BM1234ベクター

p37M1234の構築と同様の方法で構築された他のベクターは、p17M1234（731-1081）NSとp55BM1234（図1（C））である。これら3種のベクターはいずれもp17コーディング領域の下流の領域（3’側）の翻訳を可能とするが、それぞれからのgagの発現レベルは、終止コドンから3’側のヌクレオチド配列を含んだベクター（すなわち上に記載したp17M1234（731-1081），p17M1234（731-1424），p17M1234（731-2165））それぞれからのgagの発現レベルと同じであった。これらの結果はまたgag遺伝子内のINS領域は、翻訳またはINS領域でのその欠失による影響を受けないことを示している。これらの結果はHIV-1 gagコーディング領域内（すなわちHIV-1 gagの1424-2165をコードする領域の中）の付加的なINS配列を検出するためのp17M1234の用法を示す。したがってこれらの結果はまた、一種またはそれ以上の阻害/不安定性領域を含む遺伝子に変異を導入して、一つの阻害/不安定性領域を除去した後、まだその遺伝子内に存在するかもしれない付加的な阻害/不安定性領域の位置を決定するにはどうすればよいかを示している。

6．p37M1-10DおよびP55M1-10ベクター

上に記載したように、いくつかの実験からHIV-1の$p17^{gag}$領域に同定され除去されているINSに加えて、HIV-1のp24とp15領域の中にINSの存在が示されている。これはシュワルツら（Schwartz et al.）のJ. Virol. 66:7176-7182（1992）の7180ページの図6に模式的に描かれている。この図においてcgagM1234はp55BM1234と同一である。

付加的なgagおよびpol配列を含む$p24^{gag}$タンパク質をコードするベクターでの、$p24^{gag}$タンパク質の発現の研究から、完全なgag遺伝子と部分的なpol遺伝子を含んだベクター（たとえばベクターp55BM1234図6参照）は、上に記載の$p17^{gag}$中のINS-1を除去しても高レベルで発現されないことが見出された。本発明者らは、これが互いに独立に作用しうる複合的なINS領域の存在によるものと仮定した。付加的なINSを除去するため、数種の変異HIV-1オリゴヌクレオチドを構築し（表2参照）、様々なgag発現ベクターに組み込んだ。たとえばM6gag，M7gag，M8gag，M10gagの各オリゴヌクレオチドをp37M1234に導入してp37M1-10Dを作製し、また同じオリゴヌクレオチドをp55BM1234に導入してp55BM1-10を作製した。これらの実験により$p37^{gag}$（$p17^{gag}$と$p24^{gag}$前駆タンパク質にあたる）と$p55^{gag}$（HIV-1により産生されるインタクトなgag前駆分子にあたる）の発現は、M6gag，M7gag，M8gag，

M10gagオリゴヌクレオチド（表2に記載）に含まれる付加的な変異をp37M1234とp55BM1234発現ベクターに導入することで、劇的に改善されることが明らかとなった。図6は付加的な変異の導入後、発現が劇的に改善されることを示している。
特に興味深いのは、きわめて高レベルのgagを産生するp37M1-10Dである。これはこれまでにもっとも高レベルのgag産生構築である（図6参照）。面白いことに、p55BM1-10とp55AM1-10ベクター（図6）のようにgagおよびpol配列を付加すると、gagの発現レベルは減少した。さらに変異を導入するにつれ、この領域のベクターp55M1-13P0に対する阻害効果は、図6に示すように部分的に消失した。gag領域ヌクレオチドであるM10gag，M11gag，M12gag，M13gagとpol領域ヌクレオチドであるM0polにより決定される変異を導入すると、gagの発現レベルはp55BM1-10などのベクターに対しおよそ６倍に増大する。
p37M1-10Dとp55M1-13P0のHIV-1プロモーターをヒトサイトメガロウイルス早期プロモーター（CMV）に置換して、それぞれpCMV37M1-10DとpCMV55M1-13P0を作製した。このためCMVプロモーターを含む断片（+1を転写開始点としてヌクレオチド-670から+73，ボシャートら（Boshart et al.）Cell，41，521（1985）を参照）をPCRにより増幅した。この断片をgagベクターp37M1-10Dとp55M1-13P0のStuI-BssHII断片と交換し、HIV-1プロモーターをCMVプロモーターに置換した。この結果得られたプラスミドでヒト細胞を形質転換後、HIV-1プロモーターを含むプラスミドと比較したところ、同様にgagの高発現が得られた。したがってgagは、他のウイルスタンパク質が全く存在しなくても、高発現することが可能である。HIV-1を他のプロモーターと交換することは、構成的発現が望ましい際に有利であり、またマウス細胞などのようにHIV-1プロモーターが弱い他の哺乳類細胞での発現にも有利である。
構築されたベクターp37M1-10Dとp55BM1-10を用いて、それぞれ$p37^{gag}$、$p55^{gag}$タンパク質をRev非依存的に産生させた。またこれらのベクターを有用なレポーターとして用いて、異なるRNA分子の付加的なINSの同定と除去を行った。
本明細書に記載された実験操作を用いて、gp41（HIV-1 envの膜貫通部分）コーディング領域内とHIV-1のenvよりも3’側に、INSを含む領域を同定した。INSをgag，pol，envの領域から除去すると、HIV-1のRev制御因子の非存在下で本来のHIV-1構造タンパク質の高レベルの発現が可能となる。変異をもったコーディング配列を適当な遺伝子発現ベクターに組み込むことで、特定の細胞の遺伝子ターゲッティングおよび／あるいはより効率的な遺伝子発現が可能となる。あるいは変異をもったコーディング配列を用いて、in vitroまたはin vivoのヒトまたは他の細胞で直接発現させ、高いタンパク質レベルで産生させたり強い免疫応答を引き起こすことを目指すことができる。いずれの場合にも究極的に目指す点は、それによりHIVの感染と病気から守ることである。
記載された実験は、阻害/不安定配列がHIV-1の発現を防ぐのに必要であることを示している。このウイルス構造タンパク質の発現障害は、Rev-RRE相互作用により抑圧することができる。INSの非存在下ではHIV-1の発現はより単純なレトロウイルスに似て、Revを必要としないであろう。したがってINSはRevによる制御に必要な因子である。配列の比較は、実験により確認されている訳ではないが、ここで同定されたINS因子がこれまでに単離された全てのHIV-1で保存されていることを示唆している。gagの変異されたヌクレオチドの大部分（28のうち22）は、これまでに単離された全てのHIV-1で保存されているが、28のうち22はHIV-2でも保存されている（G.マイヤースら（G. Myers et al.）編Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences（Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1991）を本明細書に参考文献として取り入れた）。何通りかの証拠から、レンチウイルスとHTLVグループなどの他の複合レトロウイルスの全てが、同様のINS制御エレメントを含むことが示されている。強いINSエレメントがHTLV-IとSIVのgag領域に同定されている（投稿準備中）。このことはINSが重要な制御エレメントであり、複合レトロウイルスの何らかの生物学的特性の要因であることを示唆する。SIVとHTLV-IにINSが存在することは、これらの因子が複合レトロウイルス間で保存されていることを示唆する。INSが発現を阻害することから、その存在はウイルスに有利に働くと結論されるはずである。さもなければこうした配列は突

然変異で迅速に除去されていたであろう。
阻害/不安定配列が他のウイルスタンパク質の非存在下で作用し、突然変異の導入で不活化されうるという観察結果は、これらの因子が、mRNAと作用し遺伝子発現を転写後の段階で阻害するような細胞内因子の結合標的であることを示唆する。HIV-1 mRNAとそうした因子の相互作用の結果、核に保持されて、mRNAはさらにスプライシングされたり迅速に分解されるのかもしれない。スプライシング装置の構成要素がHIV-1 mRNA上のスプライス部位と作用して、mRNAの発現を調節するということが提唱されている（A.コクランら（A. Cochrane et al.）J. Virol. 65:5305-5313（1991）；D. チャンとP.シャープ（D. Chang and P. Sharp）Cell 59:789-795（1989）；X. ルら（X. Lu et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7598-7602（1990））。しかし本明細書に記載した阻害/不安定性エレメントが5'または3'のスプライス部位として機能するとは考えにくい。HIV-1のスプライス部位の完全なマッピングが、いくつかの研究室で逆転写酵素-PCR法を用いて行われているが、gagの中にはいかなるスプライス部位も検出されていない（S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol. 64:2519-2529（1990）；J. グアテリら（J. Guatelli et al.）J. Virol. 64:4093-4098（1990）；E. D.ギャレットら（E. D. Garrett et al.）J. Virol. 65:1653-1657（1991）；M.ロバートグロフら（M. RobertGuroff et al.）J. Virol. 64:3391-3398（1990）；S. シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol. 64:5448-5456（1990）；S. シュワルツら（S. Schwartz et al.）Virology 183:677-686（1991））。RevがスプライスされていないmRNAをスプライスソームから遊離させる際に作用する（D.チャンとP.シャープ（D. Chang and P. Sharp）Cell 59:789-795（1989））、またはスプライシングを阻害して作用する（J.ケムスら（J. Kjems et al.）Cell 67:169-178（1991））という推測は、いかなるレトロウイルスも不要のスプライス部位を含んだmRNAからしか構造タンパク質を産生しない、という知見と容易には一致しない。Rev非存在下でのHIV-1 mRNAも含めて、レトロウイルスのmRNAのスプライシングはすべて、細胞性のmRNAのスプライシングと比較して効率が悪い（J.ケムスら（J. Kjems et al.）Cell 67:169-178（1991）;A.クライナーら（A. Krainer et al.）Gene Dev. 4:1158-1171（1990）；R. カッツとA.スカルカ（R. Katz and A. Skalka）Mol. Cell. Biol. 10:696-704（1990）；C. ストルツフスとS.フォガルティー（C. Stoltzfus and S. Fogarty）J. Virol. 63:1669-1676（1989））。レトロウイルスの大多数はRev様のタンパク質を産生しないが、部分的にスプライシングされたmRNAから効率良くタンパク質を発現することから、不要のスプライス部位による発現阻害はレトロウイルス全般の特性ではないと推測される。変異を導入して、機能するスプライス部位を欠失させたHIV-1 gagとenv mRNAを発現する構築を用いた実験は、Revの非存在下ではこれらのmRNAが低レベルでしか蓄積せず、これらの発現がRev依存的であることを示している（M.エマーマンら（M. Emerman et al.）Cell 57:1155-1165（1989）；B.フェルバーら（B. Felber et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1495-1499（1989）；M.マリムら（M. Malim et al.）Nature（London）338:254-257（1989））。これによりRevはスプライシングとは独立に作用するという結論（B.フェルバーら（B. Felber et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1495-1499（1989）；M.マリムら（M. Malim etal.）Nature（London）338:254-257（1989））とHIV-1 mRNA上にはスプライス部位以外の阻害/不安定性エレメントが存在するという提唱（C.ローゼンら（C. Rosen et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2071-2075（1988）；M.ハッツポロークラダラスら（M. Hadzopoulou-Cladaras et al.）J. Virol. 63:1265-1274（1989）；B.フェルバーら（B. Felber et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1495-1499（1989））が導かれる。

gag発現プラスミドの構築

プラスミドp17RはpNL17Rと記載されてきた（S.シュワルツら（S.Schwartz et al.）J.Virol. 66:150-159（1992））。プラスミドp17はp17Rを制限酵素Ａｓｐ７１８で消化し、再度ライゲーションすることにより作製した。この操作により3'LTRの上流にあたるヌクレオチド8021-8561に広がるRREとHIV-1配列が欠失した。$p17^{gag}$の変異体を作製するため、$p17^{gag}$コーディング配列を修飾したpBLUESCRIPTベクター（Stratagene社）にサブクローニングし、ウラシルを含んだ一本鎖DNAを産生した。部位特異的変異導入を記載されたとお

り行った（T.クンケル（T. Kunkel）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492（1985）；S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）Mol. Cell. Biol. 12:207-219（1992））。適当な変異を含んだクローンは、二重鎖DNAの塩基配列決定により選択した。p19Rを作製するには、まずプラスミドp17RをBssHIIとEcoRIで消化することによりp17^{gag}のコーディング配列全体、すなわちp17^{gag}AUGの6ヌクレオチド上流からp17^{gag}の終止コドンの3’側のリンカー配列9ヌクレオチドまでを除いた。p17Rのp17^{gag}コーディング配列を、PCR増幅したRSV p19^{gag}コーディング配列を含んだDNA断片で置換した（R.ワイスら（R. Weiss et al.）RNA Tumor Viruses. Molecular Biology of Tumor Viruses（Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1985））。この断片はRSV gagのAUGの上流8ヌクレオチドとp19^{gag}コーディング配列およびそれにすぐに続く翻訳終止コドンを含んでいる。RSV gag断片は感染性RSVプロウイルスクローンS-RA（R. ワイスら（R. Weiss et al.）RNA Tumor Viruses. Molecular Biology of Tumor Viruses（Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1985））に由来する。p19はp19Rからヌクレオチド8021-8561に広がるRREと3’HIV-1配列を含むようなAsp718断片を削除することにより作製した。

gag発現プラスミドによるHLtat細胞の形質転換

HLtat細胞（S.シュワルツら（S. Schwartz et al.）J. Virol. 64:2519-2529（1990））の形質転換は、カルシウム共沈法（F.グラハムらとA.ファンデルエブ（F. Graham et al. and A. Van der Eb）Virology 52:456-460（1973））を用いて記載（B.フェルバーら（B. Felber et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1495-1499（1989））のとおり行い、5μgのp17, p17R, p17M1234, p19またはp19Rを2μgのRev発現プラスミドpL3crev（B.フェルバーら（B. Felber et al.）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1495-1499（1989））の非存在下（－）または存在下（＋）で用いた。形質転換時のDNA総量は、pUC19キャリアDNAを用いて60mmプレートあたり0.5ml中に17μgの沈澱物となるよう調整した。形質転換の20時間後細胞を集め、細胞抽出物を12.5%変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動にかけ、ヒトHIV-1患者血清（Scripps社）またはウサギ抗p19^{gag}血清を用いた免疫ブロッティングにより解析した。pRSV-ルシフェラーゼ（J.デウェットら（J. de Wet et al.）Mol. Cell. Biol. 7:725-737（1987））はホタルのルシフェラーゼ遺伝子をRSV LTRプロモーターにつないだものを含んでいるが、これを形質転換の効率の対照実験の内部標準として用い、記載（L.ソロミンら（L. Solomin et al.）J. Virol. 64:6010-6017（1990））のとおり定量した。結果は図2に示した。

ノザンブロット解析

HLtat細胞を上述の記載どおり形質転換し、形質転換の20時間後に集めた。総RNAをヘパリン/DNase法（Z.クラウチックとC.ウ（Z. Krawczyk and C. Wu）Anal. Biochem. 165:20-27（1987））により調製し、総RNAの20μgについて記載されたとおり（M.ハッツポロークラダラスら（M. Hadzopoulou-Cladaras et al.）J. Virol. 63:1265-1274（1989））ノザンブロット解析を行った。フィルターは、HIV-1 3’LTRのヌクレオチド8304-9008に広がるDNA断片をPCR増幅し、ニック翻訳したものに対しハイブリダイゼーションさせた。結果は図3に示した。

実施例２

ＨＩＶ－１ＥＮＶ遺伝子

ｅｎｖ遺伝子断片をベクターｐ１９あるいはｐ３７Ｍ１２３４に挿入し、得られたプラスミドの発現をＨＬｔａｔ細胞に形質転換することによって分析した。いくつかの断片はたんぱく質発現を阻害することが見いだされた。同定された強力なＩＮＳのうち１つはヌクレオチド８２０６－８５６１（”断片［８２０６－８５６１］”）を含んでいる断片中にある。このＩＮＳを除去するために以下のオリゴヌクレオチドが合成され、上述に特定したような突然変異導入実験に使用した。断片はＨＸＢ２とほとんど同一の分子クローンｐＮＬ４３由来である。本明細書中で使用されている番号付の体系は一貫して分子クローンＨＸＢ２の番号付けに従う。合成オリゴヌクレオチドはｐＮＬ４３配列に従う。

断片［８２０６－８５６１］への突然変異導入に使用し、ヌクレオチド８２１０－８５５

５間のｅｎｖコード領域中に変異を加えたオリゴヌクレオチド（小文字は突然変異を導入したヌクレオチドを示す）は：

#1:

8194-8261

GAATAGTGCTGTTAACcTcCTgAAcGCtACcGCtATcGCcGTgGCgGAaGGaACcGAc AGGGTTATAG (SEQ ID NO: 10)

#2

8262-8323

AAGTATTACAAGCcGCcTAccGcGCcATcaGaCAtATcCCccGccGcATccGcCAGGG CTTG (SEQ ID NO: 11)

#3

8335-8392

GCTATAAGATGGGcGGtAAaTGGagcAAgtcctccGTcATcGGcTGGCCTGCTGTAAG (SEQ ID NO: 12)

#4

8393-8450

GGAAAGAATGcGcaGgGCcGAaCCcGCcGCcGAcGGaGTtGGcGCcGTATCTCGAGAC (SEQ ID NO: 13)

#5

8451-8512

CTAGAAAAACAcGGcGCcATtACctcctctAAcACcGCcGCcAAtAAcGCcGCTTGTG CCTG (SEQ ID NO: 14)

#6

8513-8572

GCTAGAAGCACAgGAaGAaGAgGAaGTcGGcTTcCCcGTtACcCCTCAGGTACCTTTA AG (SEQ ID NO: 15)

ｍＲＮＡおよびタンパク質両方の分析によって決定されたように、断片［８２０６－８５６１］中のＩＮＳを除去することによってｅｎｖの発現が増加した。

ＨＩＶ－１ｅｎｖ中のＩＮＳをさらに詳細に特徴付けるために、ｅｎｖコード領域を適切な合成オリゴヌクレオチドを用いてＰＣＲによって作成した異なる断片に分離して、ベクターｐ３７Ｍ１－１０Ｄにクローン化した。このベクターは上述したようにさらに突然変異を導入することによってｐ３７Ｍ１２３４より作成した。ヒト細胞に導入した後、ベクターｐ３７Ｍ１－１０Ｄは高レベルでｐ３７^{gag}タンパク質を生産した。どんな強力なＩＮＳ要素をこのベクターに組換えてもｇａｇ発現を阻害しない。使用したｅｎｖ断片のまとめは図１１に示す。この実験の結果は、ＨＩＶ－１　ｇａｇのように、ＨＩＶ－１　ｅｎｖ中に発現を抑制する多くの領域が存在し、このような領域が組合さることで相加的あるいは合成的な抑制が生じる。例えば、断片１、２、あるいは３は個々には発現を２－６倍抑制するが、これらの断片を組み合わせると発現を３０倍抑制する。これらの結果に基

づいてさらなる突然変異を導入したオリゴヌクレオチドがｅｎｖ　ＩＮＳの抑制のために合成された。これらのオリゴヌクレオチドは以下に詳細に記述するように、Ｒｅｖ非依存性ＨＩＶ－１　ｅｎｖ発現プラスミドの改良のためにＨＩＶ－１　ｅｎｖのための発現ベクターｐ１２０ｐＡおよびｐ１２０Ｒ２７０（図７参照）に導入された。

１．ｇｐ１６０および細胞外領域（ｇｐ１２０）に対するｍＲＮＡが欠如していて、その発現はシスにＲＲＥ、トランスにＲｅｖの存在に依存する

１．１　ＨＩＶのｅｎｖｍＲＮＡ発現の正及び負の決定因子

ｅｎｖを発現するｃＤＮＡの同定及び特徴付けのこれまでの実験によりＥｎｖはエキソン４ＡＥ，４ＢＥ，あるいは５Ｅを含むｍＲＮＡより生産されることが実証された（Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６４：５４４８－５４５６（１９９０）；Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１２：２０７－２１９（１９９２））。ｅｎｖの発現を決定するために作成したすべての構築物はｐＮＬ１５Ｅ由来である。このプラスミドはＨＩＶ－１　ＬＴＲプロモーター、全長のｅｎｖ　ｃＤＮＡ１５Ｅおよびポリアデニル化シグナルのあるＨＩＶ３’ＬＴＲを含む（Ｓｃｈｗａｒｔｚ，ら．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６４：５４４８－５４５６（１９９０））（図７）。ｐＮＬ１５Ｅは分子クローンｐＮＬ４－３由来で（ｐＮＬ４－３は本明細書中のｐＮＬ４３と同一である）（Ａｄａｃｈｉら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５９：２８４－２９１（１９８６）、ｔｅｖ　ｍＲＮＡを生じるのに使用されるエキソン６Ｄのスプライス受容部位を欠いている（Ｂｅｎｋｏら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６４：２５０５－２５１８（１９９０））。Ｅｎｖ発現プラスミドをＲｅｖ発現プラスミドｐＬ３ｃｒｅｖ（Ｆｅｌｂｅｒら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６４：３７３４－３７４１（１９９１））の存在下あるいは非存在下にて構成的にＴａｔを発現している（Ｔａｔ１エキソン）ＨＬｔａｔ細胞（Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６４：２５１９－２５２９（１９９０））に形質転換した。１日後、細胞をＲＮＡおよびタンパク質を分析するために集菌した。全ＲＮＡを抽出し、ノーザンブロット分析した。タンパク質産物は細胞と結合したＥｎｖを検出するためにウエスタンブロットによって測定した。Ｒｅｖが存在しないと、ＮＬ１５Ｅ　ｍＲＮＡは効率的にスプライスされて、Ｎｅｆを産生し；Ｒｅｖが存在すると、ほとんどのＲＮＡはスプライスされないままで、前駆体の分泌部分であるｇｐ１２０およびｇｐ４１に加工されるＥｎｖ前駆体ｇｐ１６０を生産する。

ＩＮＳの効果をスプライシングと区別して別々に研究するために、使用したいくつかの断片内に存在する既知のスプライス部位を以下に論じたように除去した。生産されるｍＲＮＡの大きさの決定を含めた生じた発現ベクターの分析により、スプライシングはデータの解釈に影響を与えないということが実証された。

１．２　Ｅｎｖ発現は機能的なスプライス部位がなくてもＲｅｖ依存性である

ｅｎｖ発現におけるスプライシングの影響を研究するために、ｎｔ５５９２のスプライス供与体を部位特異的突然変異導入によって（ＧＣＡＧＴＡをＧａＡｔＴｃに変化させ、ＥｃｏＲＩ部位を導入した）除去し、その結果プラスミド１５ＥＳＤを作成した（図７）。この構築物からのｍＲＮＡは効率的にスプライスされて、Ｎｅｆをコードする小さなｍＲＮＡを生産した（図８）。配列分析によってスプライスされたｍＲＮＡはｎｔ５６０５（ＴＡＣＡＴｇｔａａｔｇ）に位置する別のスプライス供与体およびｎｔ７９２５の共通のスプライス受容位の利用によって生じたということが明らかになった。発表された仕事とは反して（Ｌｕら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７：７５９８－７６０２（１９９０））、この変異体からのＥｎｖ発現はＲｅｖに依存した。次に、スプライス受容位をｎｔ７９２５に突然変異を導入した。先のｃＤＮＡクローニングによりｎｔ７９２５のスプライス受容位に加えて、ｎｔ７８９７およびｎｔ７９０１（Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６４：２５１９－２５２９（１９９０））の２つのさらなるスプライス受容位があることが明らかにされたので、ｎｔ７８８４からｎｔ７９２６に広がる４３ｂｐの領域を除去した。これでｐ１５ＥＤＳＳが生じた（図７）。この構築物で形質転換したＨＬｔａｔ細胞からのｍＲＮＡをノーザンブロット分析したところ、１５ＥＤＳＳｍＲＮＡはスプライスされないことが確証された（図８Ｂ）。すべての機能的な

スプライス部位をｐ１５ＥＤＳＳから除去したにもかかわらず、ＲｅｖはＥｎｖ産物にいまだ必要である（図８Ａ）。ｇａｇ発現の研究により得られたデータと併せると、これらの結果は非効率的に使用されるスプライス部位の存在はＲｅｖ依存的Ｅｎｖ発現の第一決定因子ではないことが示唆される。少なくとも２つの使用されないスプライス部位がこのｍＲＮＡ中に存在することが知られている（ｎｔ５６０５の選択的スプライス供与体およびｎｔ６２６９エキソン６Ｄのスプライス受容位）。それゆえ、スプライシングを遂行しない初期のスプライソソーム形成がおこりうる可能性は除外できない。これはｍＲＮＡが核の中にとどまるのに十分で、スプライシングが起こらないためｍＲＮＡの分解を導く可能性がある。あるいは、ｇａｇ／ｐｏｌ領域内の同定されたもの（ＩＮＳ）と同様のスプライス部位非依存性ＲＮＡ要素がＲｅｖ依存性に重要である可能性がある（Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：７１７６－７１８２（１９９２）；Ｓｃｈｗａｒｔｚら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１５０－１５９（１９９２））。

１．３　ｇｐ１２０ｍＲＮＡ内の負因子の同定

これらの可能性を区別するために、このようなＩＮＳ要素の位置を決定できるように様々な構築物を設計した。まず始めにＮｒｕＩおよびＭｌｕＩの制限酵素部位を伴う停止コドンをプラスミドＮＬ１５ＥＤＳＳ上のｎｔ７３０１の細胞外ｇｐ１２０および膜貫通タンパク質ｇｐ４１のあいだの切断部位に導入し、ｐ１２０ＤＳＳ（図７）を作成した。Ｐ１２０ＤＳＳで形質転換した細胞の培地からのｇｐ１２０の免疫沈降によりＲｅｖ存在下でのみｇｐ１２０が高レベルで生産されることを確証した（図９Ｂ）。細胞に付着して残っている量はごくわずかに検出できる程度なので、ｇｐ１２０の放出はとても効率的である（データは示さない）。この発見により、ｅｎｖ　ｃＤＮＡのｇｐ４１部分の翻訳はｅｎｖ発現の失陥に関与する可能性が否定される。次に、ｇｐ１２０の３’領域の終止コドン（ＲＲＥおよび３’ＬＴＲを含むｇｐ４１を含む）をＳＶ４０ポリアデニル化シグナルで（図７）置き換えた。この構築物ｐ１２０ｐＡは、Ｒｅｖ非存在下でｇｐ１２０をとても低いレベルで生産した（図９Ｂ）。Ｅｎｖの背景のレベルはＲＲＥを含むｇｐ４１の５’部分（ＭｌｕＩからｎｔ８２００のＨｐａＩ）（図９Ｂ）を除去することによってｐＢＳ１２０ＤＳＳから作成したｐ１２０ＤＲ（図７）より測定した。これらの結果はｇｐ１２０部位内に主要なＩＮＳ様配列が存在することを示す。このｍＲＮＡに対するＲｅｖの効果を研究するために、異なるＲＲＥ（ＲＲＥ３３０，ＲＲＥ２７０，およびＲＲＥＤ３４５（Ｓｏｌｏｍｉｎら．，Ｊ．Ｖｉｒｉｌ．６４：６０１０－６０１７（１９９０））をｐ１２０ｐＡのｇｐ１２０終止コドンの下流に挿入してそれぞれｐ１２０Ｒ３３０，ｐ１２０Ｒ２７０，およびｐ１２０ＲＤ３４５を作成した（図７）。免疫沈降により、トランスにＲｅｖおよびシスにＲＲＥが存在するとｇｐ１２０を発現するプラスミドの欠損を補うことができることが示された。高レベルのｇｐ１２０がＲｅｖ存在下でｐ１２０Ｒ３３０（データは示さない）、ｐ１２０Ｒ２７０，およびｐ１２０ＲＤ３４５（図９Ｂ）より生産された。

ノーザンブロット解析により（図８Ａ）タンパク質におけるデータが確証された。Ｒｅｖが存在するとｐＢＳ１２０ＤＳＳ，ｐ１２０Ｒ２７０，およびｐ１２０ＲＤ３４５によって生産された高レベルのｍＲＮＡが蓄積した。低いが検出できる程度のＲＮＡはｐ１２０ＤｐＡおよびｐ１２０ＤＲより生産された。

２．２つの戦略を用いたｅｎｖｍＲＮＡ領域内に位置するＩＮＳ要素の同定

ｉｎ　ｖｉｖｏで抑制制御効果を持つ要素を同定するために、ｅｎｖ　ｃＤＮＡ断片を２つの異なる試験発現ベクターｐ１９およびｐ３７Ｍ１－１０Ｄに挿入した。これらのベクターは、遺伝子産物の迅速な検出のための強力なプロモーター（例えば、Ｔａｔ存在下のＨＩＶ－１ＬＴＲ）および高レベルで発現して、測定が容易である指標遺伝子（例えば、どちらも既知のＩＮＳ様要素を含んでいないＲＳＶのｐ１９^{gag}あるいはＨＩＶ－１（ｐ３７Ｍ１－１０Ｄ）の突然変異の入ったｐ３７^{gag}遺伝子）を含む。発現ベクターｐ１９はＨＩＶ－１ＬＴＲプロモーター、ＲＳＶｐ１９^{gag}基質遺伝子、および完全な３’ＬＴＲを含むＫｐｎＩ（ｎｔ８５６１）で始まるＨＩＶ－１配列（Ｓｃｈｗａｒｔｚ，ら．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：７１７６－７１８２（１９９２））を含む。ＨＬｔａｔ細胞に形

質転換すると高レベルのｐ１９ｇａｇが構成的に生産され、ウエスタンブロットで視覚化された。発現ベクターｐ３７Ｍ１－１０ＤはＨＩＶ－１ＬＴＲプロモーター、突然変異の入ったｐ３７ｇａｇ（Ｍ１－１０）、およびＫｐｎＩ（ｎｔ８５６１）で始まるウイルスの３’部分を含む。ＨＬｔａｔ細胞に形質転換するとこのプラスミドはＨＩＶ－１ｐ２４^{gag}抗原捕捉測定によって定量できるｐ３７^{gag}を構成的に生産する。

２．１　ＲＳＶ　ｇａｇ発現ベクターを用いたＩＮＳ要素の同定

ｇｐ４１およびｇｐ１２０部分内のＩＮＳ要素が同定された。この末端にベクターｐ１９が使用され、以下の断片（図１０）が挿入された：（Ａ）ｎｔ７６８４から７９５９；（Ｂ）ｎｔ７６８４から７８８４およびｎｔ７９２７から７９５９；これは断片Ａと同様であるがスプライス受容部位７Ａ，７Ｂおよび７の領域が欠失している；（Ｃ）ｎｔ７５９５から７８８４およびｎｔ７９２７から７９５９でＢのようにスプライス部位が欠失している；（Ｄ）ｎｔ７９３９から８０６６；（Ｅ）ｎｔ７９３９から８４１６；（Ｆ）ｎｔ８２００から８５６１（ＨｐａＩ－ＫｐｎＩ）；（Ｇ）もとのままのＲＲＥを含むｎｔ７２６６から７５９５；（Ｈ）スプライス供与部位ＳＤ５が欠失しているｎｔ５５２３から６１９０

断片Ａ，Ｂ，およびＤはＧａｇ発現に影響をおよぼさなかったが、断片Ｇ（ＲＲＥ）はｇａｇ発現が約５倍減少した。断片Ｃ，Ｅ，およびＨはＧａｇ発現を約１０－２０倍下げ、ＩＮＳ要素の存在を示唆した。

興味深いことに、プラスミドｐ１９中の３５０ｂｐにおよぶ断片Ｆの挿入はＧａｇ生産を阻害することが観察され、この要素内の強力なＩＮＳの存在を示唆した。シスにＲＲＥおよびトランスにＲｅｖが存在することはＲＳＶｐ１９^{gag}の高レベルの生産を生じる。断片ＦはまたＨＩＶ－１（ｐ１７Ｍ１２３４）のＩＮＳを修正した（ＩＮＳ－ｃｏｒｒｅｃｔｅｄ）ｐ１７^{gag}の発現にわずかに抑制制御効果を持つ。これらの実験によりｐ１９^{gag}発現を阻害するｅｎｖ　ｍＲＮＡ内に位置する多くの要素の存在が明らかになった。

２．２　断片Ｆ内のＩＮＳの除去

Ｅｎｖのアミノ酸組成に影響を与えずにこの３３０ｎｔ領域内に１０３の点突然変異を導入した６つの合成オリゴヌクレオチド（表３）を作成した。ＩＮＳ要素が破壊されたことを証明するために、変異を導入した断片Ｆをｐ１９で試験した。オリゴ＃１内への変異の導入はｐ１９^{gag}発現に影響を与えるには不十分だった一方、すべてのオリゴ（＃１から＃６）が存在すると断片ＦのＩＮＳ効果を完全に不活性化した。これは、ＩＮＳ効果を除去するためにはＩＮＳ要素内の１つ以上の領域を突然変異を導入する必要があるという別の例である。

このＩＮＳ要素がｔａｔ，ｒｅｖおよびｎｅｆのような多重にスプライスされたＲｅｖ非依存性ｍＲＮＡすべてに存在することは注目に値する。ｔａｔｃＤＮＡからこの断片を除去することによって小さなｍＲＮＡ内の断片Ｆの機能を決定するための実験を行った。このｍＲＮＡに関連して、この要素は弱いＩＮＳ効果（３－５倍の阻害）しか与えないことから、ｅｎｖ　ｍＲＮＡ中の発現阻害は少なくとも２つの離れた要素の存在が必要であることが示唆される。これらの結果はｅｎｖ内のＩＮＳ効果は多くの相互作用する成分に基づくということが示唆される。あるいは、多様なＩＮＳ成分間の相対的な位置および相互作用がＩＮＳ効果の大きさに重要であるかも知れない。それゆえ、異なるベクター中の１つ以上の型の解析がＩＮＳの同定及び除去に必要であるかも知れない。

２．３　ｐ３７Ｍ１－１０Ｄ発現ベクターを用いたＩＮＳ要素の同定

ｅｎｖコード領域を異なる連続した断片に分離した。これらの断片およびそれらの組合せを図１１に示したようなオリゴを用いてＰＣＲで増幅し、ｐ３７Ｍ１－１０Ｄ中の突然変異の導入されたｐ３７^{gag}遺伝子の下流に挿入した。プラスミドをＨＬｔａｔ細胞に形質転換し、翌日に集菌してｐ２４^{gag}発現を解析した。図１１は、１＋２＋３の組合せおよび断片２、３、５の存在は実質的にｇａｇ発現を低下させることを示す。Ｅｎｖのアミノ酸組成を変化させずにヌクレオチドを変化させることによってｅｎｖコード領域内に位置する３つのＡＡＴＡＡＡ要素を含むＡＴリッチなドメインを変化させる異なるオリゴ（表４）を合成した。第一のアプローチで、これらのオリゴ１－１９を停止点とともにプラス

ミドｐ１２０Ｒ２７０中に導入し、あるいはＲｅｖ非依存的な方法でｇｐ１２０を生産する。それからオリゴ２０－２６のようなオリゴヌクレオチドを２つのｅｎｖ部位が結合したｇｐ４１部位に導入し、完全なｇｐ１６０はＲｅｖ非依存的な方法で発現する。

実施例３

原癌遺伝子Ｃ－ＦＯＳ

ｆｏｓ遺伝子断片をｐ１９ベクターに挿入して、作成したプラスミドの発現をＨＬｔａｔ細胞中に形質転換して解析した。いくつかの断片がタンパク質発現を阻害することが見いだされた。強力なＩＮＳがヌクレオチド３３２８－３４５０（”断片［３３２８－３４５０］”）を含む断片中に同定された（ｆｏｓ遺伝子のヌクレオチドはＧｅｎｅｂａｎｋシーケンスエントリーＨＵＭＣＦＯＴ，ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ＃Ｖ０１５１２に従って数えられている）。さらに、少し弱い要素がコード領域中に同定された。

これらのＩＮＳを除去するために以下のオリゴヌクレオチドを合成し、上述に特定したような突然変異を導入する実験に使用した。

ｆｏｓをコードしない領域中のＩＮＳを除去するために、ヌクレオチド［３３２８－３４５０］間のｆｏｓをコードしない領域中を変化させた以下のオリゴヌクレオチド（小文字は突然変異の入ったヌクレオチドを示す）を合成し、断片［３３２８－３４５０］に突然変異を導入するために使用した：突然変異を導入する実験は上述に特定する：

#1:

3349-3391

TGAAAACGTTcgcaTGTGTcgcTAcgTTgcTTAcTAAGATGGA (SEQ ID NO: 16)

#2:

3392-3434

TTCTCAGATAccTAgcTTcaTATTgccTTaTTgTCTACCTTGA (SEQ ID NO: 17)

これらのオリゴヌクレオチドはベクターｐ１９，ｐ１７Ｍ１２３４あるいはｐ３７Ｍ１２３４中に挿入されたｆｏｓ断片［３３２８－３４５０］に突然変異を導入するために使用され、作成したプラスミドの発現はＨＬｔａｔ細胞に形質転換した後に解析する。

ｆｏｓ発現はこのＩＮＳ領域の除去によって増加することが期待される。

コード領域中のＩＮＳ要素をさらに特定し除去するために、ｆｏｓのさらに長い領域をベクターｐ３７Ｍ１２３４中に導入する。コード領域中のＩＮＳ要素はこの発現ベクターを使用してまずより正確に位置づけされ、それから以下のオリゴヌクレオチドを用いて訂正する：

#1
2721-2770
GCCCTGTGAGtaGGCActGAAGGacAGcCAtaCGtaACatACAAGTGCCA (SEQ ID NO: 18)

#2
2670-2720
AGCAGCAGCAATGAaCCTagtagcGAtagcCTgAGtagcCCtACGCTGCTG (SEQ ID NO: 19)

#3
2620-2669
ACCCCGAGGCaGAtagCTTtCCatccTGcGCtGCcGCtCACCGCAAGGGC (SEQ ID NO: 20)

#4
2502-2562
CTGCACAGTGGaagCCTcGGaATGGGcCCtATGGCtACcGAatTGGAaCCaCTGTGCA CTC (SEQ ID NO: 21)

ｆｏｓ発現はこのＩＮＳ領域の除去によって増加することが期待された。

実施例４

ＨＩＶ－１　ＰＯＬ遺伝子

ＡＷ　Ｃｏｃｈｒａｎｅら．，”ヒト免疫不全ウイルス構造遺伝子発現を抑制する遺伝子内配列の同定および特徴付け”，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：５３０５－５３１３（１９９１）によって特徴付けられたＨＩＶ－１のｐｏｌ遺伝子から阻害／不安定配列を除去するためにベクターｐ３７Ｍ１２３４が使用された。これらの研究者はＣＲＳと名付けたｐｏｌ中の領域（ＨＩＶヌクレオチド３７９２－４０５２）が阻害に重要であるということを示唆した。ヌクレオチド３７００－４１９４を含むこの領域よりも大きい断片をベクターｐ３７Ｍ１２３４中に挿入し、作成したプラスミド（プラスミドｐ３７Ｍ１２３４ＲＣＲＳ）（図１２参照）からのｐ３７ｇａｇ発現の効果をＨＬｔａｔ細胞に形質転換した後に分析した。

ｇａｇ発現の強い阻害（１０倍、図１３を参照）が観察された。

このＩＮＳを除去するために、以下のオリゴヌクレオチドを合成し（小文字は変異を導入したヌクレオチドを示す）、突然変異を導入する実験に使用した。

まず、１つのＡＵＵＵＡ潜在的不安定要素がＩＮＳ領域内にあることが観察された。これをオリゴヌクレオチドＭ１０ｐｏｌを用いて変異を導入することによって除去し、プラスミドｐ３７Ｍ１２３４ＲＣＲＳＰ１０を作成した。このプラスミドからのｇａｇ発現は増加せず、ＡＵＵＵＡ要素の除去のみではＩＮＳを除去したことにならないことを示した。図１２参照。それゆえ、さらなる変異導入が行われ、ＣＲＳを欠くプラスミドと同様のプラスミドｐ３７Ｍ１２３４ＲＣＲＳ中に導入された変異の組合せがｇａｇタンパク質の高レベルの生産に必要で十分であることが示された。ＩＮＳの除去に必要な変異は図１３に示す。

上述の結果によりＨＩＶ－１ｐｏｌは記述した技術で検出及び除去可能なＩＮＳ要素を含むことが示された。

これらの結果はまたＡ．Ｗ．Ｃｏｃｈｒａｎｅら．，上述、によって定義されたＣＲＳ中の最小阻害領域の外側の領域が発現レベルに影響を及ぼすことを示唆する。これらの結果

は領域のＲＮＡ構造が発現阻害に重要であることを示唆する。

表１

配列番号と図４中のヌクレオチドとの対応

配列番号	図４	
1	ヌクレオチド　３３６－７３１	
2	ヌクレオチド　４０２－４５２	
3	ヌクレオチド　５３６－５８３	上のライン
4	ヌクレオチド　５８５－６３４	上のライン
5	ヌクレオチド　６５４－７０３	上のライン
6	ヌクレオチド　４０２－４５２	下のライン（Ｍ１）
7	ヌクレオチド　５３６－５８３	下のライン（Ｍ２）
8	ヌクレオチド　５８５－６３４	下のライン（Ｍ３）
9	ヌクレオチド　６５４－７０３	下のライン（Ｍ４）

表２

ＨＩＶ－１ｇａｇおよびｐｏｌ領域の

突然変異導入に使用した合成オリゴヌクレオチド

上方の配列はHIV_{HXB2R}中に見いだされる野生型ＨＩＶ－１であり、下方は突然変異の入ったオリゴヌクレオチド配列である。配列の位置は括弧内に示した。

M5gag (778-824)
CACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCT (SEQ ID NO: 22)
XX X X X X X X
CACCTAGAACccTgAAcGCcTGGGTgAAgGTgGTAGAAGAGAAGGCT (SEQ ID NO: 23)

M6gag (871-915)
CCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGAC (SEQ ID NO: 24)
X XX X X X X X
CCACCCCACAgGAccTgAACACgATGtTgAACACcGTGGGGGGAC (SEQ ID NO: 25)

M7gag (1105-1139)
CAGTAGGAGAAATTTATAAAAGATGGATAATCCTG (SEQ ID NO: 26)
X X X X X
CAGTAGGAGAgATcTAcAAGAGgTGGATAATCCTG (SEQ ID NO: 27)

M8gag (1140-1175)
GGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACC (SEQ ID NO: 28)
X X X X X X
GGATTgAACAAgATcGTgAGgATGTATAGCCCTACC (SEQ ID NO: 29)

M9gag (1228-1268)
ACCGGTTCTATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAG (SEQ ID NO: 30)
X X X XX X X
ACCGGTTCTAcAAgACcCTgcGgGCtGAGCAAGCTTCACAG (SEQ ID NO: 31)

M10gag (1321-1364)
ATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGCGGCTACACTA (SEQ ID NO: 32)
X XX X X XX X X
ATTGTAAGACcATcCTgAAgGCtcTcGGcCCAGCGGCTACACTA (SEQ ID NO: 33)

M11gag (1416-1466)
AGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACCATAATG (SEQ ID NO: 34)
X X X X X X X X X
AGAGTTTTGGCcGAgGCgATGAGCCAgGTgACgAAcTCgGCgACCATAATG (SEQ ID NO: 35)

M12gag (1470-1520)
CAGAGAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGATTGTTAAGTGTTTCAATTGT (SEQ ID NO: 36)
X XX XX X X X
CAGAGAGGCAAcTTccGGAACCAgcGgAAGATcGTcAAGTGTTTCAATTGT (SEQ ID NO: 37)

M13gag (1527-1574)
GAAGGGCACACAGCCAGAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGGGCTGT (SEQ ID NO: 38)

X X X XX X
GAAGGGCACACcGCCAGgAAcTGCcGGGCCCCccGGAAgAAGGGCTGT (SEQ ID NO: 39)

M14gag (1581-1631)
TGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAAT (SEQ ID NO: 40)

X X X X X X X X X
TGTGGAAAGGAgGGgCACCAgATGAAgGAcTGcACgGAGcGgCAGGCTAAT (SEQ ID NO: 41)

M0pol (1823-1879) (K to R difference introduced)
CCCCTCGTCACAATAAAGATAGGGGGGCAACTAAAGGAAGCTCTATTAGATACAGGAG (SEQ ID NO: 42)

X X X X X XX X
CCCCTCGTCACAgTAAgGATcGGGGGGCAACTcAAGGAAGCgCTgcTcGATACAGGAG (SEQ ID NO: 43)

M1pol (1936-1987)
GATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTC (SEQ ID NO: 44)

X X X X X X X X X X
GATAGGGGGgATcGGgGGcTTcATCAAgGTgAGgCAGTAcGAcCAGATACTC (SEQ ID NO: 45)

M2pol (2105-2152)
CCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCA (SEQ ID NO: 46)

X X X X X X X X
CCTATTGAGACgGTgCCcGTgAAgTTgAAGCCgGGgATGGATGGCCCA (SEQ ID NO: 47)

M3.2pol (2162-2216)
CAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAGA (SEQ ID NO: 48)

X X X X X X X X
CAATGGCCATTGACgGAAGAgAAgATcAAgGCcTTAGTcGAAATcTGTACAGAGA (SEQ ID NO: 49)

M4pol (2465-2515)
TTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGACACCA (SEQ ID NO: 50)
X X X X X X X X X
TTCAGGAAGTAcACgGCgTTcACCATcCCgAGcATcAACAAcGAGACACCA (SEQ ID NO: 51)

M5pol (2873-2921)
TTAGTGGGGAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTACCCAGGGATTAAAG (SEQ ID NO: 52)
XX X X X X X
TTAGTGGGGAAggTGAAcTGGGCgAGcCAGATcTACCCgGGGATTAAAG (SEQ ID NO: 53)

M6pol (3098-3150)
GGCCAATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGG (SEQ ID NO: 54)
X X X X X X X X X X
GGCCAATGGACgTAcCAgATcTAcCAgGAGCCgTTcAAgAAcCTGAAAACAGG (SEQ ID NO: 55)

M7pol (3242-3290)
TGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAACTGCCCATACAAAAGGAAACATGGG (SEQ ID NO: 56)
X X X X X X X X
TGGGGAAAGACgCCgAAgTTcAAgCTGCCCATcCAgAAGGAgACATGGG (SEQ ID NO: 57)

M8pol (3520-3569)
GAAGACTGAGTTACAAGCAATTTATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTAG (SEQ ID NO: 58)
X X X X X X X XX X
GAAGACTGAGcTgCAgGCgATcTAcCTgGCgcTGCAGGAcTCGGGATTAG (SEQ ID NO: 59)

M8.2pol (3643-3698)
GTTAGTCAATCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAGGTCTATCTGGCAT (SEQ ID NO: 60)
X X X X X X X X X
GTTAGTCAAcCAAATcATcGAGCAGcTgATcAAgAAGGAgAAGGTgTATCTGGCAT (SEQ ID NO: 61)

M9pol (3749-3800)
GTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCC (SEQ ID NO: 62)
X X X X XX X X X X
GTCAGTGCTGGgATCcGGAAgGTgCTATTccTgGAcGGgATcGATAAGGCCC (SEQ ID NO: 63)

M9.2pol (3806-3863)
GAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTGCCAC (SEQ ID NO: 64)
X X XXX X X X X X X X X
GAACATGAGAAgTAcCACtccAAcTGGcGcGCtATGGCcAGcGAcTTcAACCTGCCAC (SEQ ID NO: 65)

M10pol (3950-4001)
GGAATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCCTGGTAG (SEQ ID NO: 66)
X X X X X XX X X X X X
GGAATATGGCAgCTgGAcTGcACgCAccTgGAgGGgAAgGTgATCCTGGTAG (SEQ ID NO: 67)

M11pol (4031-4096)
GCAGAAGTTATTCCAGCAGAAACAGGGCAGGAAACAGCATATTTTCTTTTAAAATTAG -CAGGAAGA (SEQ ID NO: 68)
X X X X X X X X X XX X X X
GCAGAAGTTATcCCtGCtGAAACtGGGCAGGAgACcGCcTAcTTcCTgcTcAAAcTcG -CAGGAAGA (SEQ ID NO: 69)

M12pol (4097-4151)
TGGCCAGTAAAAACAATACATACTGACAATGGCAGCAATTTCACCGGTGCTACGG (SEQ ID NO: 70)
X X X X X X X X X X
TGGCCAGTgAAgACgATcCAcACgGACAAcGGaAGCAAcTTCACtGGTGCTACGG (SEQ ID NO: 71)

M13pol (4220-4271)
GGAGTAGTAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAA (SEQ ID NO: 72)
X X X X X X X X
GGAGTAGTAGAATCcATGAAcAAgGAAcTgAAGAAgATcATcGGACAGGTAA (SEQ ID NO: 73)

M12pol-p (4097-4151) (indicates the sequence found in p37M1234RCRSP10+P12p

TGGCCAGTAAAAACAATACAcACgGACAAcGGaAGCAAcTTCACtGGTGCTACGG (SEQ ID NO: 74)

表３

断片ＦのＩＮＳ効果を除去するために作成した変異オリゴの配列

断片ＦのＩＮＳ効果を除去するために使用した６つのオリゴヌクレオチド（オリゴ＃１から＃６）は実施例２に既に記載した（配列番号　１０－１５）。

表４

ｅｎｖコード領域内のＩＮＳ要素を破壊するために作成した変異オリゴの配列

２６の異なる領域の野生型（上）および変異オリゴ（下）を示す。

ＨＩＶ－１のｅｎｖのための変異オリゴ：

M1 (5834-5878) 46-mer
CTTGGGATGTTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTC (SEQ ID NO: 75)
X X X X X X XX
CTTGGGATGcTGATGATcTGcAGcGCcACcGAgAAgcTGTGGGTC (SEQ ID NO: 76)

M2 (5886-5908) 24-mer
ATTATGGGGTACCTGTGTGGAAG (SEQ ID NO: 77)
X X X
ATTATGGcGTgCCcGTGTGGAAG (SEQ ID NO: 78)

M3 (5920-5956) 38-mer
CACTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCATATGAT (SEQ ID NO: 79)
X X X X X X X
CACTCTATTcTGcGCcTCcGAcGCcAAgGCATATGAT (SEQ ID NO: 80)

M4 (5957-5982) 27-mer
ACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCAC (SEQ ID NO: 81)
X X X X
ACAGAGGTgCAcAAcGTcTGGGCCAC (SEQ ID NO: 82)

M5 (6006-6057) 53-mer
CCAACCCACAAGAAGTAGTATTGGTAAATGTGACAGAAAATTTTAACATGTG (SEQ ID NO: 83)
X X X X XX X X X X X X
CCAACCCcCAgGAgGTgGTgcTGGTgAAcGTGACcGAgAAcTTcAACATGTG (SEQ ID NO: 84)

M6 (6135-6179) 46-mer
TAACCCCACTCTGTGTTAGTTTAAAGTGCACTGATTTGAAGAATG (SEQ ID NO: 85)
X X X XX X X XX
TAACCCCcCTCTGcGTgAGccTgAAGTGCACcGAccTGAAGAATG (SEQ ID NO: 86)

M7 (6251-6280) 31-mer
ATCAGCACAAGCATAAGAGGTAAGGTGCAG (SEQ ID NO: 87)
X XX X X
ATCAGCACcAGCATccGcGGcAAGGTGCAG (SEQ ID NO: 88)

M8 (6284-6316) 34-mer
GAATATGCATTTTTTTATAAACTTGATATAATA (SEQ ID NO: 89)
X X X X X X
GAATATGCcTTcTTcTAcAAgCTgGATATAATA (SEQ ID NO: 90)

M9 (6317-6343) (28-mer)
CCAATAGATAATGATACTACCAGCTAT (SEQ ID NO: 91)
X X X X
CCAATAGcTAAgGAcACcACCAGCTAT (SEQ ID NO: 92)

M10 (6425-6469) (46-mer)
GCCCCGGCTGGTTTTGCGATTCTAAAATGTAATAATAAGACGTTC (SEQ ID NO: 93)
X X X X X X X X X
GCCCCGGCcGGcTTcGCGATcCTgAAgTGcAAcAAcAAGACGTTC (SEQ ID NO: 94)

M11 (6542-6583) (42-mer)
CAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGTAGTA (SEQ ID NO: 95)
X X X X X X X X
CAACTGCTGcTgAAcGGCAGcCTgGCcGAgGAgGAGGTAGTA (SEQ ID NO: 96)

M12 (6590-6624) (35-mer)
TCTGTCAATTTCACGGACAATGCTAAAACCATAAT (SEQ ID NO: 97)
X X X X X
TCTGCCAAcTTCACcGACAAcGCcAAgACCATAAT (SEQ ID NO: 98)

M13 (6632-6663) (32-mer)
CTGAACACATCTGTAGAAATTAATTGTACAAG (SEQ ID NO: 99)
X X X X X X
CTGAACCAgTCcGTgGAgATcAAcTGTACAAG (SEQ ID NO: 100)

M14 (6667-6697) (31-mer)
CAACAACAATACAAGAAAAAGAATCCGTATC (SEQ ID NO: 101)
X X X XX X
CAACAACAAcACcGGcAAgcGcATCCGTATC (SEQ ID NO: 102)

M15 (6806-6852) (47-mer)
GCTAGCAAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTT (SEQ ID NO: 103)
XX XX X X X X X X X X X
GCTAGCAAgcTgcGcGAgCAgTAcGGgAAcAAcAAgACcATAATCTT (SEQ ID NO: 104)

M16 (nt 6917-6961) (45-mer)
TTCTACTGTAATTCAACACAACTGTTTAATAGTACTTGGTTTAAT (SEQ ID NO: 105)
X X X X X X X X X
TTCTACTGgAAcTCcACcCAgCTGTTcAAcAGcACcTGGTTTAAT (SEQ ID NO: 106)

M17 (nt 7006-7048) (43-mer)
CACAATCACCCTCCCATGCAGAATAAAACAAATTATAAACATG (SEQ ID NO: 107)
X X X X X X X X X
CACAATCACcCTgCCcTGCcGcATcAAgCAgATcATAAACATG (SEQ ID NO: 108)

M18 (nt 7084-7129) (46-mer)
CATCAGTGGACAAATTAGATGTTCATCAAATATTACAGGGCTGCTA (SEQ ID NO: 109)
X X XX X X X X X X X
CATCAGCGGcCAgATccGcTGcTCcTCcAAcATcACcGGGCTGCTA (SEQ ID NO: 110)

M19 (nt 7195-7252) (58-mer)
GAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTA (SEQ ID NO: 111)
X X X XX X X X X X X X X X
GAGGGACAAcTGGAGgAGcGAgcTgTAcAAgTAcAAgGTgGTgAAgATcGAACCATTA (SEQ ID NO: 112)

M20 (nt 7594-7633) (40-mer)
GCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAG (SEQ ID NO: 113)
X X X X X X X
GCCTTGGAAcGCcAGcTGGAGcAAcAAgTCcCTGGAACAG (SEQ ID NO: 114)

M21 (nt 7658-7689) (32-mer)
GAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAG (SEQ ID NO: 115)
X X X X X
GAGTGGGACcGcGAgATcAACAAcTACACAAG (SEQ ID NO: 116)

M22 (nt 7694-7741) (48-mer)
ATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAA (SEQ ID NO: 117)
X X X X X X X X X X X
ATACACTCCcTgATcGAgGAgTCcCAgAACCAgCAgGAgAAGAATGAA (SEQ ID NO: 118)

M23 (nt 7954-7993) (40-mer)
CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGAC (SEQ ID NO: 119)
X X X X X X X X
CAGGCCCGAgGGcATcGAgGAgGAgGGcGGcGAGAGAGAC (SEQ ID NO: 120)

M24 (nt 8072-8121) (50-mer)
TACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACT (SEQ ID NO: 121)
X X X X X X X X X
TACCACCGCcTGcGcGACcTgCTCcTGATcGTgACGAGGATcGTGGAACT (SEQ ID NO: 122)

M25 (nt 8136-8179) (44-mer)
GGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAGTATTGG (SEQ ID NO: 123)
X X X X X
GGTGGGAgGCCCTCAAgTAcTGGTGGAAcCTCCTcCAGTATTGG (SEQ ID NO: 124)

M26 (nt 8180-8219) (40-mer)
AGTCAGGAACTAAAGAATAGTGCTGTTAGCTTGCTCAATG (SEQ ID NO: 125)
X X X X X X X X
AGTCAGGAgCTgAAGAAcAGcGCcGTgAaCcTGCTCAATG (SEQ ID NO: 126)

注釈：

オリゴヌクレオチドの大部分はＨＸＢ２配列に従ったが、いくつか例外がある：

オリゴＭ１５ではｎｔ６８０７はｐＮＬ４３配列に従う。（具体的には、ｎｔ６８０７はＮＬ４３ではＣであるが、ＨＸＢ２ではＡである。）オリゴＭ２６はｐＮＬ４３由来のヌクレオチド配列を持つ。

実施例５

免疫予防措置あるいは免疫治療におけるＰ３７Ｍ１－１０ＤあるいはＰ５５Ｍ１－１３ＰＯの使用

出生後の遺伝子治療において、身体から標的細胞を除去して、それらに新しい遺伝情報を持ったウイルスのベクターを感染し、それからそれらを身体中に再び移植するといった間接的な方法で；あるいはリポソーム中に処方したＤＮＡをカプセル化する；ウイルス外殻受容タンパク質を含むプロテオリポソームにＤＮＡを封入する；ＤＮＡをリン酸カルシウム共沈する；およびポリリジン糖タンパク質担体複合体にＤＮＡを結合させるといった直接的な方法で新しい遺伝情報が組織中に導入されている。さらに、リン酸カルシウム共沈の形成いかんにかかわらず、直接的な肝臓内注入後のクローン化したＤＮＡ配列のｉｎｖｉｖｏにおける感染性についても記述されている。安定性を増強する要素を含むｍＲＮＡもまた正に荷電した脂肪小胞の使用でアフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｌａｅｖ

ｉｓ）胚中で効率的に転写されることが示された。例えば、Ｊ．Ａ．Ｗｏｌｆｆ，ら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４７：１４６５－１４６８（１９９０）およびその文献中に引用された参考文献を参照。

最近、純粋なＲＮＡあるいはＤＮＡを骨格筋に直接注入すると、筋細胞内で著しい遺伝子発現がおこることが示された。Ｊ．Ａ．Ｗｏｌｆｆ，ら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４７：１４６５－１４６８（１９９０）。粒子加速法（particle-acceleration）（Ｎ．Ｓ．Ｙａｎｇ，ら．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：９５６８－９５７２（１９９０）；Ｓ．Ｒ．Ｗｉｌｌｉａｍｓら．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：２７２６－２７３０（１９９１））あるいはウイルス形質転換のような他の手段によって筋細胞にＲＮＡあるいはＤＮＡを強制的に導入してもまたＤＮＡあるいはＲＮＡは安定に保持され、発現される。Ｗｏｌｆｆらで報告された実験中では、ＲＮＡあるいはＤＮＡベクターがマウス骨格筋細胞中、特に大腿四頭筋中でレポーター遺伝子を発現するために使用された。タンパク質発現が容易に検出され、特別な輸送体系はこれらの効果に必要なかった。記述した手順の注入液体の組成および量並びに注入方法を改変した場合にもポリヌクレオチドの発現が得られた。例えば、レポーター酵素活性は１０から１００μｌの低張、等張、および高張ショ糖溶液、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ，あるいは２ｍＭ$CaCl_2$を含むショ糖溶液で観察され、また、１０－から１００－μｌ注入を１分以内ではなく圧縮器で２０分以上かけて注入を行ったときに観察された。

レポーター遺伝子によってコードされるタンパク質の酵素活性はまたＲＮＡあるいはＤＮＡベクターを注入した腹筋中にも検出されたことから、他の筋もポリヌクレオチドを取り込み、発現できることを示唆された。ＲＮＡおよびＤＮＡベクターを注入した他の組織中（肝臓、すい臓、皮膚、肺、脳および血液）にも低い量のレポーター酵素が検出された。筋中に注入されたプラスミドＤＮＡはヒト以外の霊長類の筋中でも安定に発現されることが示された。Ｓ．Ｊｉａｏら．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　３：２１－３３（１９９２）。

ヒト筋内ｉｎ　ｓｉｔｕに直接遺伝子を送り込めることは、臨床への適用の可能性が有ることを示唆する。筋は、筋が病気に主に関与している場合に加え、そうでない場合にも病気の状態を変化しうる外来遺伝子のヘテロな発現に適切な可能性を有する組織である。例えば、筋組織は免疫可能で血液中に分泌され、あるいは循環する毒物代謝物をきれいにするヘテロなタンパク質の発現に使用することが可能であろう。繰り返しアクセスできるＲＮＡおよび組織の使用は、従来の薬剤的処置のように与えられて可逆な型の遺伝子転位に有用であるかもしれない。Ｊ．Ａ．Ｗｏｌｆｆ，ら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２４７：１４６５－１４６８（１９９０）およびＳ．Ｊｉａｏら．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　３：２１－３３（１９９２）。

Ｊ．Ａ．Ｗｏｌｆｆら．，上述、によって、抗原をコードする遺伝子の細胞内発現はワクチン改良発への新たなアプローチを供給しうることが提唱された。この仮定はインフルエンザＡ核タンパク質をコードしているプラスミドＤＮＡをＢＡＬＢ／ｃ　マウス大腿四頭筋内に注入すると、インフルエンザＡ核タンパク質特異的細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）が生じてウイルス肺力価の減少、体重減少の阻害、および生存上昇によってによって示されたように、続いておきるインフルエンザＡウイルスのヘテロな株の攻撃から保護される結果となるという最近の報告によって支持された。Ｊ．Ｂ．Ｕｌｍｅｒら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５９：１７４５－１７４９（１９９３）。

従って、抗原を細胞内発現して自己複製試薬またはアジュバントの必要なしに免疫系への提示のためのウイルス抗原を生産するために、ウイルス抗原をコードしているＲＮＡまたはＤＮＡベクターの直接的な注入を使用することができ、その結果、抗原特異的なＣＴＬが生産され、そして、続いて起こるウイルスのホモあるいはヘテロな株の攻撃から防御される。

マウスおよびヒトの両ＣＴＬは保存された内部ウイルスタンパク質由来のエピトープを認識することができ、ウイルスに対する免疫反応に重要であると思われている。保存されたウイルスのタンパク質のエピトープを認識することによって、ＣＴＬは株間の防御を提供

するかもしれない。保存されたウイルス抗原に特異的なＣＴＬは、一般に株特異的な抗体とは逆に、異なるウイルス株にも反応することができる。
このように、ウイルス抗原をコードするＲＮＡあるいはＤＮＡの直接注入は、直接のペプチド移入あるいはウイルスベクターに関する制限がないという利点がある。（Ｊ．Ａ．Ｕｌｍｅｒら．，上述、および該文献中の「考察」の項及び参考文献を参照。）さらに、ＤＮＡ注入後発現されるタンパク質に対し高力価の抗体が生産されることは、保存された抗原を標的としたＣＴＬワクチンと別々あるいは一緒に、保存されたあるいは保存されていない抗原を標的とした抗体ベースのワクチンを作成する容易で効率的な手段である可能性を示唆する。これらはまた伝統的なペプチドワクチンと共に使用して、組合せワクチンの生成に使用できるかもしれない。さらに、ＤＮＡ注入後タンパク質発現が維持されることから、ＢおよびＴ細胞の記憶維持は強化されており、それによって長期的な体液性および細胞性免疫を引き起こす。

１．ＨＩＶ－１に対する免疫予防措置あるいは免疫療法のためのベクター

ベクターｐ３７Ｍ１－１０Ｄあるいはｐ５５Ｍ１－１ＰＯ（図６）中の突然変異を導入したｇａｇゲノム配列をＣＭＶあるいはＲＳＶのような強力な構成的プロモーターあるいはＨＩＶ－１のような誘導可能なプロモーターを用いた発現ベクター中に挿入する。
ベクターはヒト組織への直接的なＤＮＡの注入；ヒトの初代培養細胞へのＤＮＡのエレクトロポレーションあるいは形質転換（ｅｘ　ｖｉｖｏ）、望ましい形質の細胞の選別、およびそのような細胞の身体への再導入（上述の選別はあらかじめ選別した適切なゲノム領域への導入したＤＮＡの相同的組換えでよい）；ｇａｇ遺伝子を含む感染性できる小胞の生成、ｅｘ　ｖｉｖｏでの細胞への感染およびそのような細胞の身体への再導入；あるいは上述の小胞によるｉｎ　ｖｉｖｏの直接の感染のようないくつかの技術の一つを使用して薬剤的に受容可能なキャリヤーを用いて動物あるいはヒト中に導入する。
免疫系への有効な刺激を生じる、実質的なレベルのタンパク質が生成されるであろう。
発明の別の態様では、記述した構築物を修飾し、ウイルス小胞形成に参与できないように突然変異を導入したｇａｇタンパク質を発現させる。このようなｇａｇタンパク質は野生型のｇａｇタンパク質と同定度免疫体系を刺激するが、ＨＩＶ－１生産の増加には関与できないと期待される。この修飾は免疫療法および免疫予防措置において安全なベクターとなる。

実施例６

トランス優性（ＴＤ）－ＴＤ－ＧＡＧ－ＴＤまたはＴＤ　ＧＡＧ－ＰＲＯ－ＴＤ　ＲＥＶ遺伝子を用いたＨＩＶ－１発現の阻害
ＤＮＡの直接注入あるいはレトロウイルスベクター以外のベクターの使用は細胞中でトランスに優性なｇａｇ（ＴＤｇａｇ）を構成的に高レベルに保つ。さらに、Ｂ．Ｋ．Ｆｅｌｂｅｒら．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１８４－１８７（１９８８）によって採用されたアプローチによって例えばレトロウイルスベクターによるヒト細胞への感染を干渉しないＨＩＶ－１ＴＤｇａｇをコードしたマウス由来のレトロウイルスベクターのようなレトロウイルスベクターの作成が可能になった。Ｆｅｌｂｅｒら．，上述、のアプローチにおいて、プロモーターおよびポリＡシグナルの一部を含むＨＩＶ－１ＬＴＲ断片はマウスレトロウイルスベクター内で有害な効果無しに組み込まれ、転写されないままでいることが示された。Ｔａｔタンパク質の存在によりＨＩＶ－１ＬＴＲからの転写が刺激され、ＨＩＶ－１ＬＴＲに結合した遺伝子の高レベルでの発現が生じた。
ハイブリッドＴＤｇａｇ－ＴＤＲｅｖあるいはＴＤｇａｇ－ｐｒｏ－ＴＤＲｅｖ遺伝子の作成及びヒト細胞への発現ベクターの導入によってＨＩＶ－１発現を阻害する２つのタンパク質の効率的な生産が可能になる。同一のベクター中に２つのＴＤ部分を組み込むとウイルス複製において各々の効果が増幅されると期待される。Ｂ．Ｋ．Ｆｅｌｂｅｒら．，上述、中に記載されたうちの１つと同様の方法によるＨＩＶ－１プロモーターの使用によって、感染細胞中の高レベルのｇａｇおよびｒｅｖ発現が可能になる。感染させないと、発現は実質的に低くなる。または、他の強力なプロモーターの使用によってこのようなタンパク質の構成的な発現が可能になる。このアプローチは感染可能なウイルスの生産にか

かわることができないが、実際にこのような生産に対して反対に作用する、高度に免疫原となるｇａｇの生産のため非常に有用である。これはＡＩＤＳに対する効率的な免疫予防措置あるいは免疫療法的なアプローチとして使用可能である。
トランス優性突然変異の例はＴｒｏｎｏら．，Ｃｅｌｌ　５９：１１２－１２９（１９８９）中に記載されている。
１．トランス優性ｇａｇ突然変異タンパク質をコードする構築物の作成
例えばＴｒｏｎｏら．，上述、中に記載されたようなトランス優性として作用するｇａｇ突然変異タンパク質は、トランス優性ｇａｇタンパク質を高度に構成的レベルで生産する修飾したベクターｐ３７Ｍ１－１０Ｄあるいはｐ５５Ｍ１－１３ＰＯによって作成する。
トランス優性ｇａｇタンパク質は免疫体系を刺激し、感染性ウイルスの生産を阻害するが、感染性ウイルスの生産に貢献しない。
このアプローチのさらなる安全性によってヒトへの応用がより可能になるであろう。
当業者は阻害／不安定配列を含むｍＲＮＡをコードしているいかなる遺伝子も本発明に例示した方法あるいは機能的に等価なものに従って改変できることを認識するだろう。
本発明を行うための上記に記載した方法の改変は、遺伝子工学、タンパク化学、薬学、および関連分野の当業者にとって明白であり、以下の請求項の範囲内で行われる。
本明細書中に記載された参考文献はいずれも本明細書中に完全に参考文献として組み入れられた。

【図１】

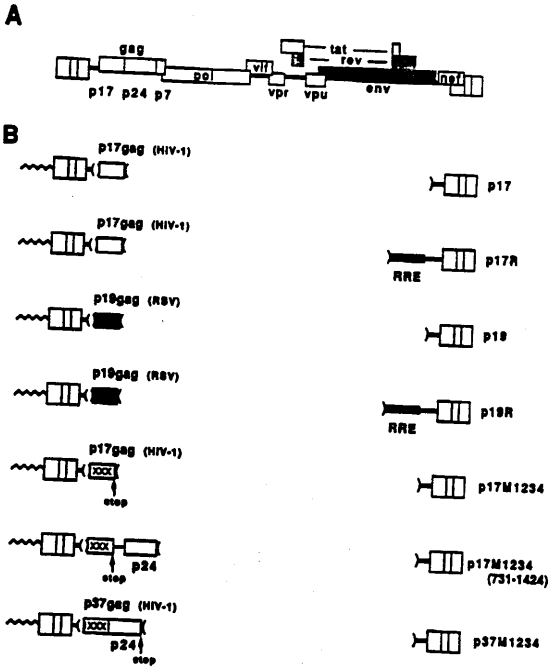


Fig. 1

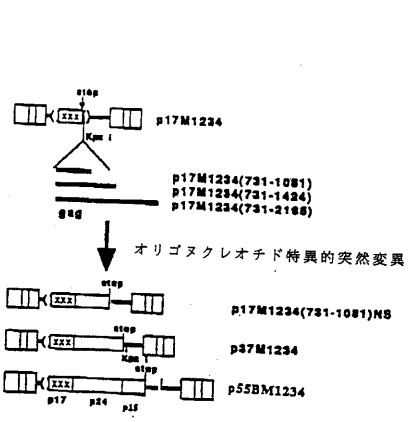


Fig. 1

【図２】

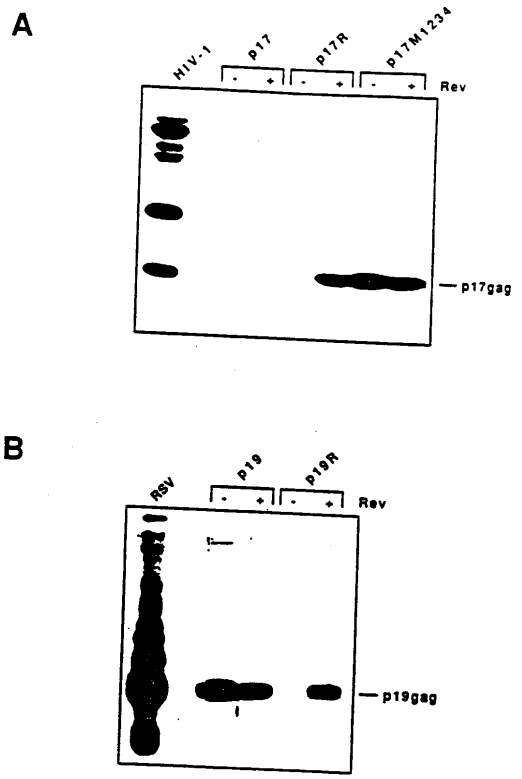


Fig. 2

【図３】

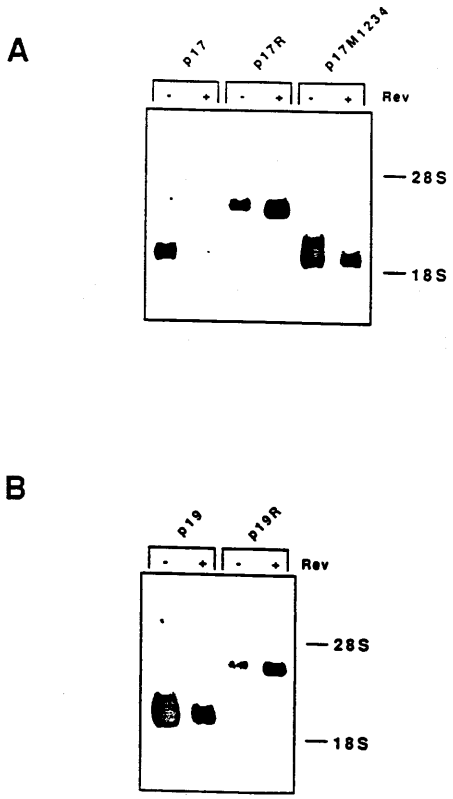


Fig. 3

【図４】

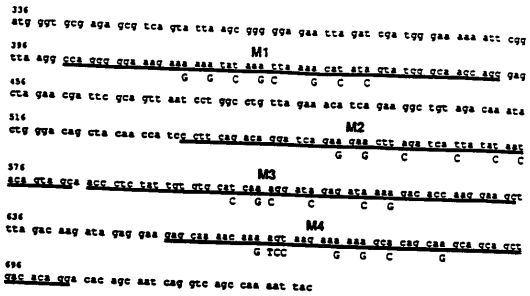


Fig. 4

【図５】

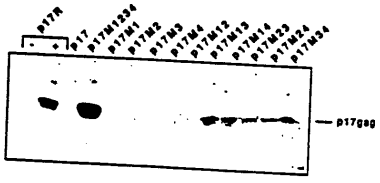


Fig. 5

【図６】

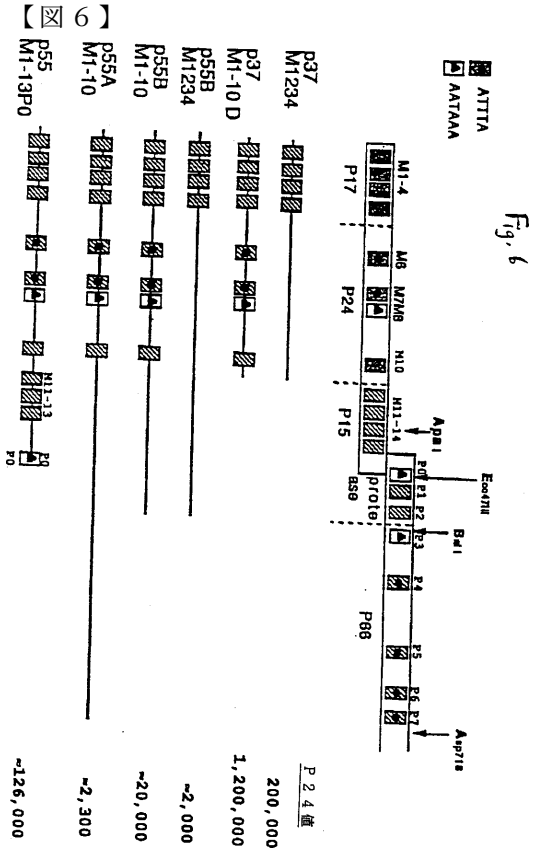


Fig. 6

【図７】

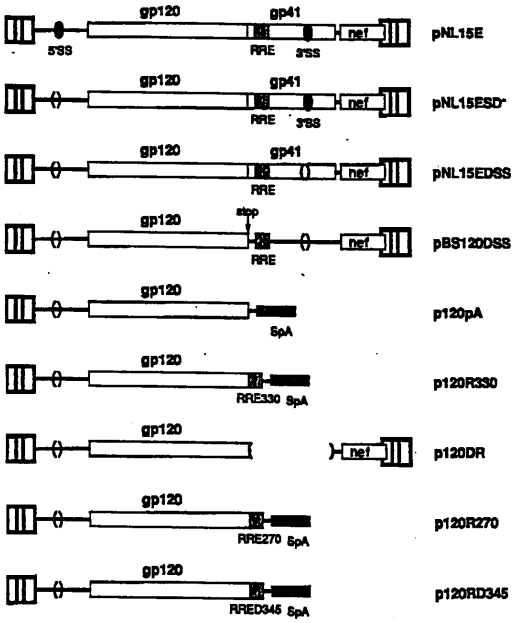


Fig. 7

【図８】

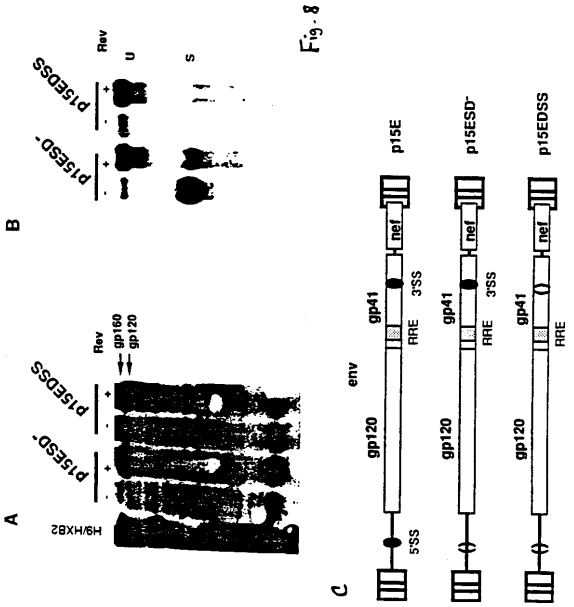


Fig. 8

【図９】

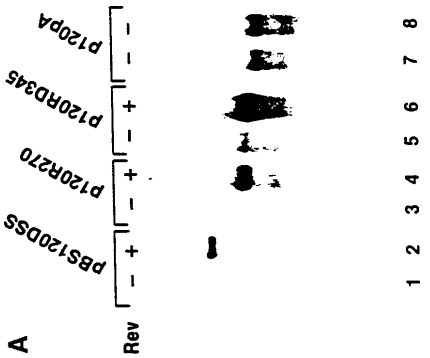


Fig. 9

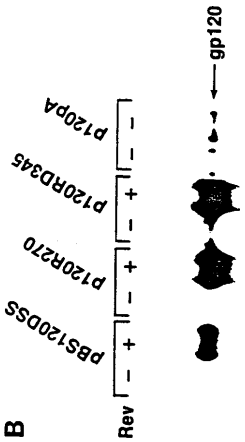
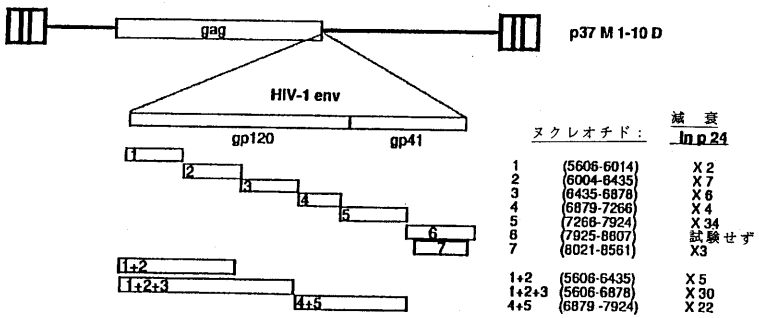


Fig. 9

【図１１】

p37M1−10Dベクターを用いたenv mRNA内のINS領域の同定

(fig 5 env, 元の fig D)



	ヌクレオチド：	減衰 In p 24
1	(5606-6014)	X 2
2	(6004-6435)	X 7
3	(6435-6878)	X 6
4	(6879-7266)	X 4
5	(7266-7924)	X 34
6	(7925-8607)	試験せず
7	(8021-8561)	X3
1+2	(5606-6435)	X 5
1+2+3	(5606-6878)	X 30
4+5	(6879 -7924)	X 22

Fig. 11

【図１３】

pol領域のCRSの抑制効果を除去する点突然変異

（ヌクレオチド 3700-4194）

GGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTT

TAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGATGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTG

CCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAAGCCATGCATGGACAAGTAGA

CTGTAGTCCAGGAATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTG

g g c c g cc g g g g g

GATATATAGAAGCAGAAGTTATTCCAGCAGAAACAGGGCAGGAAACAGCATATTTTCTTTTAAAATTAGCAGGAAGATGG

CCAGTAAAAACAATACATACTGACAATGGCAGCAATTTCACCGGTGCTACGGTTAGGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGAAT

c g c a c t

CAAGCAGGAATTTGG

Fig. 13

【図１０】

p19ベクターを用いたenv mRNA内のINS領域の同定

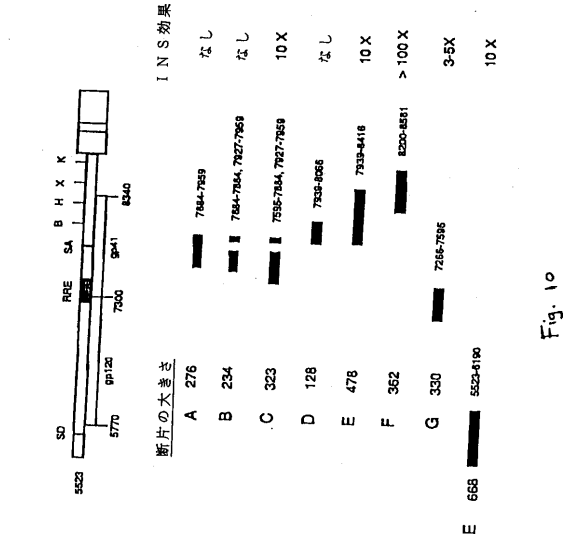


Fig. 10

【図１２】

CRSの抑制効果の除去

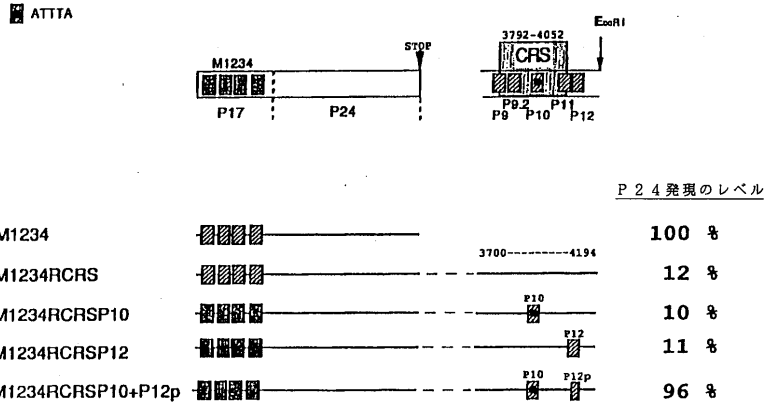


Fig. 12

【図１４Ａ】

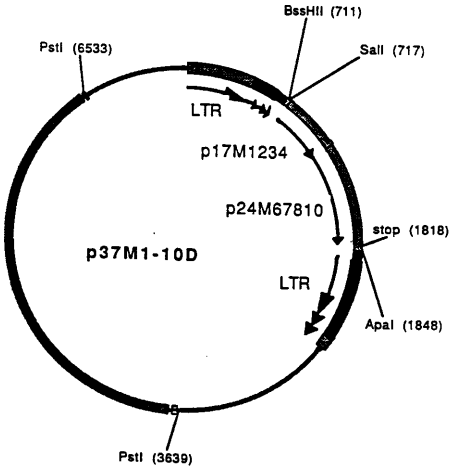


Fig. 14 A

【図１４Ｂ】

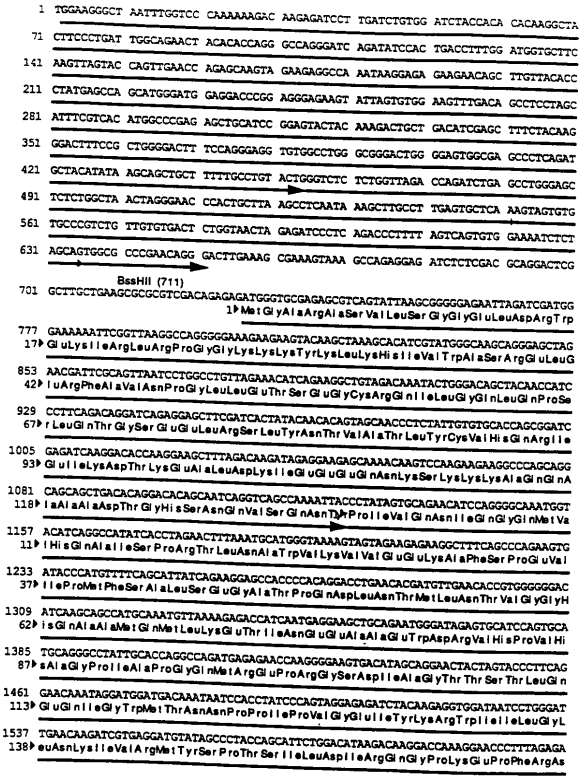


Fig. 14 B

【図１４Ｃ】

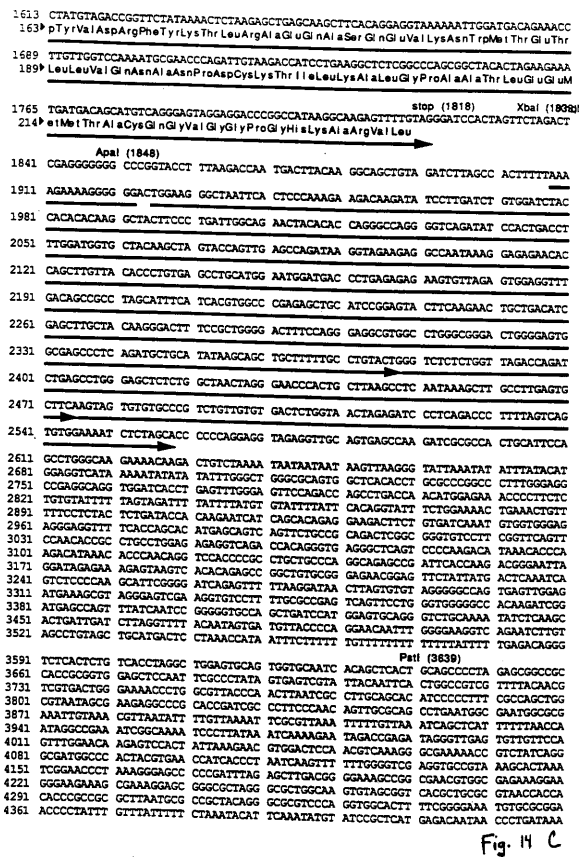


Fig. 14 C

【図１４Ｄ】

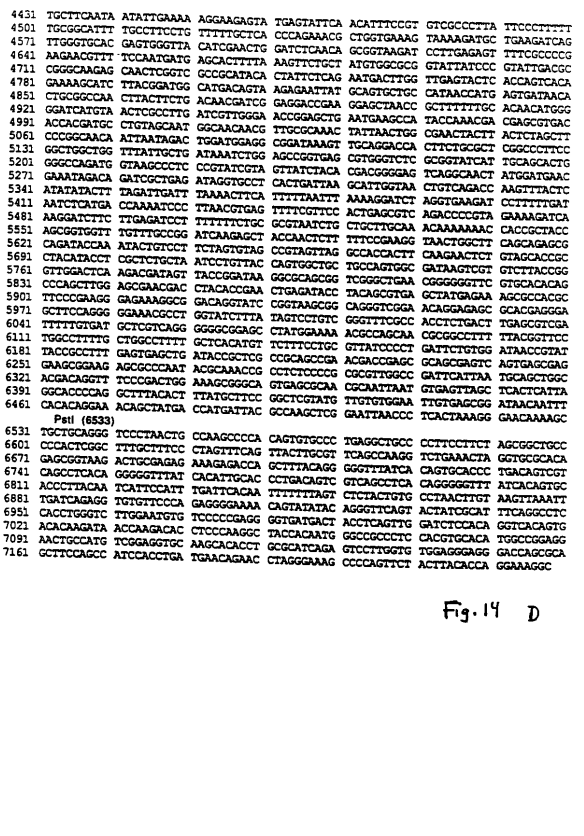


Fig. 14 D

フロントページの続き

(74)代理人 100075236
弁理士 栗田 忠彦
(74)代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74)代理人 100092886
弁理士 村上 清
(72)発明者 パヴレイキス, ジョージ・エヌ
アメリカ合衆国メリーランド州２０８５０, ロックヴィル, パーデュー・コート ９
(72)発明者 フェルバー, バーバラ・ケイ
アメリカ合衆国メリーランド州２０８５０, ロックヴィル, パーデュー・コート ９

合議体
審判長 鵜飼 健
審判官 鈴木 恵理子
審判官 小暮 道明

(56)参考文献 特表平３－５０４３３３（ＪＰ, Ａ）
特開平２－１８６９８９（ＪＰ, Ａ）
Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ（Ｊａｎ. １９９２）Ｖｏｌ. ６６, Ｎｏ. １, ｐ. １５０－１５９
Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ（１９９１）Ｖｏｌ. ８８, ｐ. ３３２４－３３２８