(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2011-142913
(P2011-142913A)
(43)公開日　平成23年7月28日(2011.7.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B050
C12N 9/00	(2006.01)	C12N	9/00		4B063
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B064
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065

審査請求 有　請求項の数 81　ＯＬ　外国語出願　（全 77 頁）　最終頁に続く

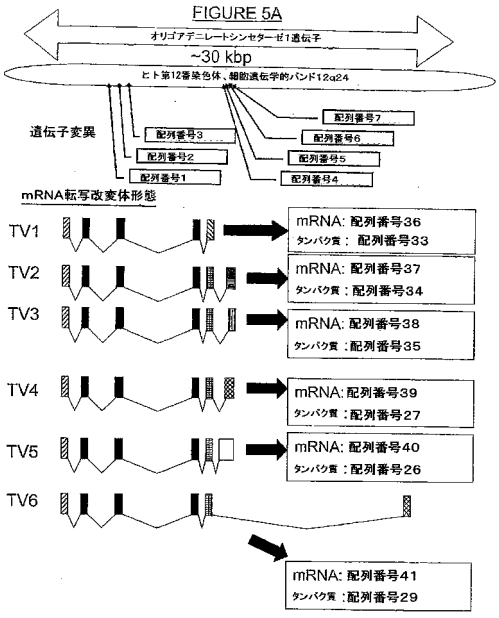
(21)出願番号　特願2011-21746 (P2011-21746)
(22)出願日　平成23年2月3日 (2011.2.3)
(62)分割の表示　特願2006-536883 (P2006-536883)の分割
原出願日　平成16年10月22日 (2004.10.22)
(31)優先権主張番号　60/513,888
(32)優先日　平成15年10月23日 (2003.10.23)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/542,373
(32)優先日　平成16年2月6日 (2004.2.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/554,758
(32)優先日　平成16年3月19日 (2004.3.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　506139417
イルミジェン　バイオサイエンシーズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４２１，レキシントン，ヘイデン　アベニュー　６５番　キュービスト　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド気付
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ウイルス感染に対する抵抗性に関連する遺伝子である、ＯＡＳ１における変異の検出

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ヒトのオリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子中の変異を検出するための方法、ならびにそのコードされるタンパク質およびそれに対する抗体の使用法を提供する。
【解決手段】Ｃ型肝炎を含むウイルス感染に対するヒトの抵抗性に関連する、ＯＡＳ１をコードする遺伝子の変異を検出するための方法。変異した遺伝子によってコードされるタンパク質、前記タンパク質に対する抗体、またヒトＯＡＳ１に対して特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびこれらを含む組成物、治療のための使用。また、ヒトＯＡＳ１のインヒビター。
【選択図】図５Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子（ＯＡＳ１）の変異を同定するためのヒトの遺伝学的スクリーニング方法であって、該方法が、参照配列の配列番号１９のヌクレオチド位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、および２１５６６３８における参照ヌクレオチドとの非参照ヌクレオチドの置換、ならびに参照配列の配列番号１９の位置２１５６５９５における参照ヌクレオチドの欠失からなる群より選択されるＯＡＳ１の点変異の存在を核酸試料において検出し、それよって該変異を同定する工程を包含する、方法。
【請求項２】
配列番号２０～配列番号３０、配列番号３２～配列番号３５および配列番号４６～配列番号５２からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、単離されたポリペプチド。
【請求項３】
配列番号７５～配列番号８４からなる群より選択される少なくとも１つのアミノ酸配列からなり、そして配列番号２０～配列番号３０、配列番号３２～配列番号３５および配列番号４６～配列番号５２からなる群より選択されるポリペプチドに対して少なくとも８０％の配列類似性を有する、単離されたポリペプチド。
【請求項４】
単離されたポリペプチドであって、配列番号７５～配列番号８４からなる群より選択される少なくとも１つのアミノ酸配列からなり、そして以下：
（ａ）配列番号２２および配列番号２５のいずれか１つの配列のアミノ酸２１９～アミノ酸２３８；
（ｂ）配列番号２３のアミノ酸２３１～アミノ酸２５０；
（ｃ）配列番号２６～配列番号２９、配列番号３３～配列番号３４、および配列番号５０のいずれか１つの配列のアミノ酸３４７～アミノ酸３６６；
（ｄ）配列番号３２のアミノ酸２９５～アミノ酸３１４；
（ｅ）配列番号４６のアミノ酸１８９～アミノ酸２０８；
（ｆ）配列番号４７のアミノ酸６１～アミノ酸８０；
からなる群より選択されるポリペプチドに対して少なくとも８０％の配列類似性を有する単離されたポリペプチド。
【請求項５】
タンパク質変換ドメインを含むポリペプチドに対して共有結合される、請求項２～請求項４のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記タンパク質変換ドメインが、配列番号８５～配列番号９４からなる群より選択されるポリペプチドで構成される、請求項５に記載のポリペプチド。
【請求項７】
前記タンパク質変換ドメインが、配列番号８５～配列番号９４からなる群より選択されるポリペプチドに対して少なくとも８０％の配列類似性を有するポリペプチドで構成される、請求項５に記載のポリペプチド。
【請求項８】
前記タンパク質変換ドメインが、アルギニン、リジン、もしくはヒスチジンの付加または置換によって、配列番号８５～配列番号９４からなる群より選択されるポリペプチドとは異なる、請求項５に記載のポリペプチド。
【請求項９】
ポリエチレングリコールに対して共有結合される、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１０】

リポソーム中に被包される、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
エンドソーム崩壊因子に対して共有結合される、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
エンドソーム崩壊因子に対して非共有結合性に結合される、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
前記エンドソーム崩壊因子が、ｐＨ感受性である、請求項１１または請求項１２に記載のポリペプチド。
【請求項１４】
糖部分に対して共有結合される、請求項２～請求項１３のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１５】
前記糖部分が、ガラクトースまたはマンノースで構成される、請求項１４に記載のポリペプチド。
【請求項１６】
（ａ）細胞によって、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチドを発現させる工程；および
（ｂ）該ポリペプチドを回収する工程；
を包含する方法によって生成される、単離されたポリペプチド。
【請求項１７】
組換え宿主細胞によって生成される、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１８】
異種なポリペプチド配列を含む、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド。
【請求項１９】
請求項２～請求項１８のいずれか１項に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有する、組成物。
【請求項２０】
請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項２１】
配列番号３１、配列番号３６～配列番号４５および配列番号５５～配列番号５６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項２２】
請求項２０および請求項２１のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、組換えベクター。
【請求項２３】
発現制御配列に対して作動可能に連結された、請求項２０および請求項２１のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。
【請求項２４】
請求項２３に記載の発現ベクターによって、形質転換されたかまたはトランスフェクトされた、宿主細胞。
【請求項２５】
前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項２３に記載の発現ベクター。
【請求項２６】
前記ベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、バキュロウ

イルス、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、トリポックスウイルスベクター、アビポックスウイルスベクター、鶏痘ウイルスベクター、カナリア痘ウイルスベクター、アルファウイルスベクター、鶏痘ウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターである、請求項２３に記載の発現ベクター。

【請求項２７】

薬学的に受容可能なキャリアからなる群より選択される第１の成分、ならびに請求項２３、請求項２５および請求項２６のいずれか１項に記載の発現ベクターからなる群より選択される第２の成分を含有する、組成物。

【請求項２８】

哺乳動物においてウイルス感染を処置する方法であって、該方法が、このような処置の必要がある哺乳動物に対して、オリゴアデニレートシンセターゼ１を含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項２９】

前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチドである、請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】

前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、前記請求項２０および請求項２１のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドによって発現される、請求項２８に記載の方法。

【請求項３１】

請求項１９および請求項２７のいずれか１項に記載の組成物を投与する工程を包含する、請求項２８に記載の方法。

【請求項３２】

前記ウイルス感染が、２本鎖ＲＮＡウイルスによる感染である、請求項２８に記載の方法。

【請求項３３】

前記ウイルス感染が、フラビウイルスによる感染である、請求項２８に記載の方法。

【請求項３４】

前記フラビウイルスが、Ｃ型肝炎ウイルスである、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記ウイルス感染が、パラミクソウイルスによる感染である、請求項２８に記載の方法。

【請求項３６】

前記ウイルス感染が、ＨＩＶ、ＲＳウイルス、インフルエンザウイルス、コロナウイルス、パラインフルエンザウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、西ナイルウイルス、デング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、およびヒトパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルスによる感染である、請求項２８に記載の方法。

【請求項３７】

前記ウイルス感染が、重症急性呼吸器症候群である、請求項２８に記載の方法。

【請求項３８】

前記哺乳動物が、前記オリゴアデニレートシンセターゼ１を、天然に産生しない、請求項２８に記載の方法。

【請求項３９】

哺乳動物において癌を処置する方法であって、該方法が、このような処置の必要がある哺乳動物に対してオリゴアデニレートシンセターゼ１を含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項４０】

前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチドである、請求項３９に記載の方法。

【請求項４１】
前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、請求項２０および請求項２１に記載のポリヌクレオチドの１つによって発現される、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
請求項１９および請求項２７のいずれか１項に記載の組成物を投与する工程を包含する、請求項３９に記載の方法。
【請求項４３】
前記癌が、前立腺癌である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４４】
請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド上のエピトープに対して指向される、モノクローナル抗体。
【請求項４５】
前記抗体が、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載の別の異なるポリペプチドと交差反応性ではない、請求項４４に記載の抗体。
【請求項４６】
薬学的に受容可能なキャリアおよび請求項４４および請求項４５のいずれか１項から選択される抗体を含有する、組成物。
【請求項４７】
請求項２０および請求項２１のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含む標的に特異的に結合する、単離された干渉するポリヌクレオチド。
【請求項４８】
標的結合部位が、少なくとも２５個の連続したヌクレオチドである、請求項４７に記載の干渉するポリヌクレオチド。
【請求項４９】
請求項４７に記載の干渉するポリヌクレオチドおよび薬学的キャリアを含有する、組成物。
【請求項５０】
配列番号１９に特異的に結合する、単離されたアンチセンスポリヌクレオチド。
【請求項５１】
請求項５０に記載のアンチセンスポリヌクレオチド、および薬学的キャリアを含有する、組成物。
【請求項５２】
請求項２０および請求項２１のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含む標的に対して指向される、単離されたリボザイム。
【請求項５３】
請求項５２に記載のリボザイムおよび薬学的キャリアを含有する、組成物。
【請求項５４】
哺乳動物においてウイルス感染を処置する方法であって、該処置の必要がある哺乳動物中のオリゴアデニレートシンセターゼ１を阻害する工程を包含する、方法。
【請求項５５】
前記オリゴアデニレートシンセターゼ１を阻害する工程が、請求項４６、請求項４９、請求項５１、請求項５３、および請求項８０のいずれか１項に記載の組成物を投与する工程を包含する、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチドである、請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
前記オリゴアデニレートシンセターゼ１は、請求項２０および請求項２１のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドによって発現される、請求項５４に記載の方法。
【請求項５８】

前記ウイルス感染が、ＨＩＶ、ＲＳウイルス、インフルエンザウイルス、コロナウイルス、パラインフルエンザウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、西ナイルウイルス、デング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、およびヒトパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルスによる感染である、請求項５４に記載の方法。

【請求項５９】

前記ウイルス感染が、重症急性呼吸器症候群である、請求項５４に記載の方法。

【請求項６０】

哺乳動物においてインスリン依存性糖尿病を処置する方法であって、該方法が、該処置の必要がある哺乳動物においてオリゴアデニレートシンセターゼ１を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項６１】

前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチドである、請求項６０に記載の方法。

【請求項６２】

前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、請求項２０および請求項２１のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドによって発現される、請求項６０に記載の方法。

【請求項６３】

前記オリゴアデニレートシンセターゼ１を阻害する工程が、請求項４６、請求項４９、請求項５１、請求項５３、および請求項８０のいずれか１項に記載の組成物を投与する工程を包含する、請求項６０に記載の方法。

【請求項６４】

前記スクリーニング方法が、ヒトにおけるウイルス感染に対する感受性を同定する、請求項１に記載の方法。

【請求項６５】

前記スクリーニング方法が、ヒトにおける糖尿病についての疾病素質を同定する、請求項１に記載の方法。

【請求項６６】

前記スクリーニング方法が、ヒトにおける精神分裂病についての疾病素質を同定する、請求項１に記載の方法。

【請求項６７】

前記スクリーニング方法が、ヒトにおける癌に対する感受性を同定する、請求項１に記載の方法。

【請求項６８】

前記癌が、前立腺癌である、請求項６７に記載の方法。

【請求項６９】

前記スクリーニング方法が、ウイルス感染についての治療的処置に対する患者の応答性を同定する、請求項１に記載の方法。

【請求項７０】

前記治療的処置が、インターフェロンに基づく処置である、請求項６９に記載の方法。

【請求項７１】

前記患者の応答が、持続性のウイルスのクリアランスによって測定される、請求項６９に記載の方法。

【請求項７２】

ヒトにおいて精神分裂病を処置するための方法であって、該方法が、該処置の必要があるヒト中のオリゴアデニレートシンセターゼ１を阻害する工程を包含する、方法。

【請求項７３】

前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチドである、請求項７２に記載の方法。

【請求項７４】

前記オリゴアデニレートシンセターゼ１が、請求項２０および請求項２１のいずれか１項のポリヌクレオチドによって発現される、請求項７２に記載の方法。
【請求項７５】
前記オリゴアデニレートシンセターゼ１を阻害する工程が、請求項４６、請求項４９、請求項５１、請求項５３、および請求項８０のいずれか１項に記載の組成物を投与する工程を包含する、請求項７２に記載の方法。
【請求項７６】
インヒビターが、小分子の薬物を含む、請求項７２に記載の方法。
【請求項７７】
インヒビターが、小分子の薬物を含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項７８】
インヒビターが、小分子の薬物を含む、請求項６０に記載の方法。
【請求項７９】
請求項２～請求項８のいずれか１項に記載のポリペプチド上のエピトープに対して指向されるモノクローナル抗体から発生される抗体フラグメント。
【請求項８０】
薬学的に受容可能なキャリアおよび請求項７９に記載の抗体フラグメントを含有する、組成物。
【請求項８１】
前記スクリーニング方法が、前記ヒトにおけるＣ型肝炎ウイルス感染に対する感受性を同定する、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（１．技術分野）
本発明は、ヒトのオリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子中の変異を検出するための方法（ここで、変異は、Ｃ型肝炎ウイルスによる感染を含む、フラビウイルス感染に対する抵抗性を与え、そして変異は、前立腺癌および糖尿病を含む、他の疾患の状態に関する）、ならびにそのコードされるタンパク質およびそれに対する抗体の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
（２．発明の背景）
多くの疾患は、これまでに、ヒト集団において感染に対する自然抵抗性が存在するということについて同定されてきた。非特許文献１は、注射薬物使用者のような高危険率群において、９０％程度高いＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）感染率を報告する。しかし、残りの１０％が、感染に対して明らかに抵抗性であることの機構は、この文献中には確認されなかった。ＨＣＶ感染に関与するタンパク質としては、２’，５’オリゴアデニレートシンセターゼが挙げられる。ＯＡＳは、アデノシンの２’，５’オリゴマー（２－５Ａ）の合成を触媒するその能力によって特徴付けられるインターフェロン誘導性タンパク質である。非特許文献２は、インターフェロンで処理されたヒト細胞が、４０ｋＤのタンパク質（ＯＡＳ１）、４６ｋＤのタンパク質（ＯＡＳ１）、６９ｋＤのタンパク質、および１００ｋＤのタンパク質に対応する数種のＯＡＳを含むことを見出した。非特許文献３は、ｐ６９に対して高度に特異的なポリクロナール抗体である、６９－ｋＤ　ＯＡＳを産生した。抗ｐ６９抗体を含む、インターフェロンで処理されたヒト細胞の発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、非特許文献４は、部分的なＯＡＳ２　ｃＤＮＡを単離した。この研究者らは、この部分的なｃＤＮＡを用いて、さらなるライブラリーをスクリーニングし、そして２つのＯＡＳ２アイソフォームをコードするｃＤＮＡを回収した。このより小さいアイソフォームは、３’非翻訳領域の長さが異なる２つのｍＲＮＡによってコードされる。
【０００３】

ノーザンブロット分析は、ＯＡＳ２が、ヒト細胞中で４つのインターフェロン誘導性のｍＲＮＡとして発現されることを示した。この予測されるＯＡＳ２タンパク質は、共通の６８３アミノ酸の配列および異なる３’末端を有する。インビトロでの転写／翻訳産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥによれば、２つのアイソフォームは、６９ｋＤおよび７１ｋＤの分子量を有する。両方のアイソフォームは、インビトロでのＯＡＳ活性を示す。配列分析は、ＯＡＳ２が、プロリンが豊富な推定リンカー領域によって隔てられる２つのＯＡＳ１相同性ドメインを含むことを示した。このＮ末端ドメインおよびＣ末端ドメインは、それぞれＯＡＳ１に対して、４１％および５３％同一である。

【０００４】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーションおよび地図化されたクローン内の封入によって、非特許文献５は、このＯＡＳ１遺伝子、ＯＡＳ２遺伝子、およびＯＡＳ３遺伝子が、１２ｑ２４．２上の１３０ｋｂ領域でクラスター化されることを決定した。２－５Ａは、ＲＮａｓｅ　Ｉに結合し、そしてそれを活性化し、この活性化されたＲＮａｓｅ　Ｉは、ウイルスのＲＮＡおよび細胞のＲＮＡを分解し、細胞のタンパク質合成の阻害およびウイルス複製の障害を生じる。

【０００５】

ＯＡＳＬと称される４番目のヒトＯＡＳ遺伝子は、ＯＡＳＬが酵素活性を欠く点で、ＯＡＳ１、ＯＡＳ２およびＯＡＳ３とは異なる。このＯＡＳＬ遺伝子は、ユビキチンの縦列反復に対して相同的な１６４アミノ酸のＣ末端ドメインに融合されるＯＡＳユニットで構成される２つのドメインを有するタンパク質をコードする。（非特許文献６；非特許文献７。）

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】ＡｌｔｅｒおよびＭｏｙｅｒ、「Ｊ．Ａｃｑｕｉｒ．Ｉｍｍｕｎｅ　Ｄｅｆｉｃ．Ｓｙｎｄｒ．Ｈｕｍ　Ｒｅｔｒｏｖｉｒｏｌ．」、１９９８年、１８　補遺１、Ｓ６－１０
【非特許文献２】Ｈｏｖａｎｅｓｓｉａｎら、「ＥＭＢＯ」、１９８７年、６、１２７３－１２８０
【非特許文献３】Ｍａｒｉｅら、「Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．」、１９８９年、１６０、５８０－５８７
【非特許文献４】ＭａｒｉｅおよびＨｏｖａｎｅｓｓｉａｎ、「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．」、１９９２年、２６７、９９３３－９９３９
【非特許文献５】Ｈｏｖａｎｉａｎら、「Ｇｅｎｏｍｉｃｓ」、１９９８年、５２、２６７－２７７
【非特許文献６】Ｅｓｋｉｌｄｓｅｎら、「Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．」、２００３年、３１、３１６６－３１７３
【非特許文献７】Ｋａｋｕｔａら、「Ｊ．Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　＆　Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｒｅｓ．」、２００２年、２２、９８１－９９３

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

ウイルス複製およびウイルス感染を阻害するこれらの役割に起因して、当該分野において、ＯＡＳ１活性に関してウイルス複製を抑制する方法および組成物に対する必要性（ＨＣＶ複製を抑制するインヒビターに基づく治療についての大きな必要性を含む）が存在する。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

（発明の簡単な要旨）

本発明は、オリゴアデニレートシンセターゼ１遺伝子中の点変異として特徴付けられる

、Ｃ型肝炎耐性に関連する変異の検出に関する。
【０００９】
１つの実施形態において、ヒトの遺伝学的スクリーニング方法が、企図される。この方法は、ヒトから単離された核酸試料を、Ｇｅｎｂａｎｋ配列登録番号ＮＴ＿００９７７５．１３を参照するオリゴアデニレートシンセターゼ１遺伝子（ＯＡＳ１）（配列番号１９として図２に示される２，１３０，０００～２，１５７，９９９ヌクレオチドの連続したヌクレオチド）における、ヌクレオチド位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、もしくは２１５６６３８における塩基の置換、またはヌクレオチド位置２１５６５９５における塩基の欠失として特徴付けられるオリゴアデニレートシンセターゼ１遺伝子の点変異の存在についてアッセイする工程を包含する。
【００１０】
好ましい実施形態において、この方法は、増幅条件下で、ヒトから得られたゲノムＤＮＡの試料を、オリゴアデニレートシンセターゼ１遺伝子（ＮＴ＿００９７７５．１３）の、ヌクレオチド位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８を含むヒトゲノムＤＮＡの領域を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）のプライマー対を用いて処理する工程を包含する。このＰＣＲ処理は、上記領域を含む増幅産物を生成し、その後、この産物は、点変異の存在についてアッセイされる。
【００１１】
さらなる実施形態において、本発明は、ＮＴ＿００９７７５．１３の位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における少なくとも１つの変異を有する遺伝子によってコードされるタンパク質、およびウイルス感染に対する抵抗性について、好ましくはフラビウイルス感染に対する抵抗性について、最も好ましくはＣ型肝炎ウイルスに対する抵抗性についての診断薬を調製するタンパク質の使用を提供する。特定の実施形態において、この診断薬は、抗体である。
【００１２】
なおさらなる実施形態において、本発明は、ウイルスによる感染、好ましくはフラビウイルスによる感染、最も好ましくはＣ型肝炎ウイルスによる感染を防ぐかまたは阻害するための治療用化合物を提供し、ここでこの治療用化合物は、ＮＴ＿００９７７５．１３の、位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における少なくとも１つの変異を有するＯＡＳ１遺伝子によってコードされるタンパク質である。他の実施形態において、この治療用化合物は、このタンパク質をコードする、ＤＮＡまたはＲＮＡのようなポリヌクレオチドである。
【００１３】
なおさらなる実施形態において、本発明は、ウイルスによる感染、好ましくはフラビウイルスによる感染、最も好ましくはＣ型肝炎ウイルスによる感染を防ぐかまたは阻害するための治療用化合物を提供し、ここでこの治療用化合物は、以下の配列のタンパク質である：配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号４６、配列番号４７、および／または配列番号４８。
【００１４】

なおさらなる実施形態において、本発明は、ウイルスによる感染、好ましくはフラビウイルスによる感染、最も好ましくはＣ型肝炎ウイルスによる感染を防ぐかまたは阻害するための治療用化合物を提供し、ここでこの治療用化合物は、ＮＴ＿００９７７５．１３の位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における少なくとも１つの変異の有利な効果を模倣する。この治療用化合物は、小分子、タンパク質分子、ペプチド分子、ＤＮＡ分子もしくはＲＮＡ分子、または抗体であり得る。

【００１５】

なおさらなる実施形態において、本発明は、癌、好ましくは前立腺癌を防ぐかまたは処置するための治療用化合物を提供し、ここでこの治療用化合物は、ＮＴ＿００９７７５．１３の、位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における少なくとも１つの変異の有利な効果を有するＯＡＳ１遺伝子によってコードされるタンパク質である。他の実施形態において、この治療用化合物は、このタンパク質をコードする、ＤＮＡまたはＲＮＡのようなポリヌクレオチドである。

【００１６】

なおさらなる実施形態において、本発明は、癌、好ましくは前立腺癌を防ぐかまたは処置するための治療用化合物を提供し、ここでこの治療用化合物は、以下の配列のタンパク質である：配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号４６、配列番号４７、および／または配列番号４８。

【００１７】

なおさらなる実施形態において、本発明は、癌、好ましくは前立腺癌を防ぐかまたは処置するための治療用化合物を提供し、ここでこの治療用化合物は、ＮＴ＿００９７７５．１３の、位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における少なくとも１つの変異の有利な効果を模倣する。この治療用化合物は、小分子、タンパク質分子、ペプチド分子、ＤＮＡ分子もしくはＲＮＡ分子、または抗体であり得る。

【００１８】

さらなる実施形態において、この治療用化合物は、ＯＡＳ１の活性、またはこのタンパク質全体の少なくとも１つの小領域もしくは下位の機能の活性を阻害し得、そしてこのような化合物は、ＯＡＳ１ポリヌクレオチドに特異的に結合し得るアンチセンス分子、リボザイム、およびＲＮＡｉ分子として示され、そしてＯＡＳ１タンパク質およびＯＡＳ１ポリペプチドに特異的に結合し得る抗体およびそのフラグメントとして示される。

【００１９】

別の実施形態において、本発明は、ＯＡＳ１のインヒビターを提供する。本発明のインヒビターとしては、アンチセンス分子、リボザイム、ＲＮＡｉ、抗体または抗体フラグメント、タンパク質またはペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なアンチセンス分子は、配列番号１９のポリヌクレオチドの、少なくとも１０個、少なくとも１５個もしくは少なくとも２０個の連続したヌクレオチド、または配列番号１９のポリヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするこれらの連続したヌクレオチドを含む。配列番号１９の配列の少なくとも２５個の連続したヌクレオチド、または配列番号１９の配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするこの連続したヌクレオチドが、さらに好ましい。

【００２０】
なおさらなる実施形態において、ＯＡＳ１のインヒビターは、配列番号３０のポリペプチドによって定義されるタンパク質の領域に特異的に結合することが想定される。本発明のインヒビターとしては、抗体、抗体フラグメント、小分子、タンパク質、またはポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。
【００２１】
なおさらなる実施形態において、ＯＡＳ１のインヒビターは、配列番号３１のポリヌクレオチドに、特異的に結合するかまたは特異的にハイブリダイズする、アンチセンス分子またはＲＮＡｉ分子で構成されることが想定される。
【００２２】
さらなる実施形態において、薬学的に受容可能なキャリア中の１つ以上のＯＡＳ１インヒビターを含有する組成物が、提供される。
【００２３】
さらなる実施形態は、ＯＡＳ１遺伝子発現またはＯＡＳ１の生物学的活性を減少させる方法を提供する。
【００２４】
さらなる実施形態は、ＮＴ　００９７７５．１３の、位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における少なくとも１つの変異を有するＯＡＳ１遺伝子の特定の形態の発現を、特異的に上昇させるか、または特異的に減少させる方法を提供する。
【００２５】
本発明は、少なくとも１つの修飾されたヌクレオチド間結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。
【００２６】
本発明は、ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを、さらに提供する。
【００２７】
本発明は、少なくとも１つの修飾された糖部分を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを、なおさらに提供する。
【００２８】
本発明はまた、２’－Ｏ－メチル糖部分である少なくとも１つの修飾された糖部分を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。
【００２９】
本発明は、少なくとも１つの修飾された核酸塩基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを、さらに提供する。
【００３０】
本発明は、５－メチルシトシンである修飾された核酸塩基を有する、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、なおさらに提供する。
【００３１】
本発明はまた、キメラオリゴヌクレオチドであるアンチセンス化合物を提供する。
【００３２】
本発明は、インビボの細胞またはインビボの組織と、ヒトＯＡＳ１をコードする核酸分子に対して標的化された、８～３５ヌクレオチド長のアンチセンス化合物またはリボザイムとを接触させて、その結果、ヒトＯＡＳ１の発現が、阻害される工程を包含する、ヒトの細胞またはヒトの組織におけるヒトＯＡＳ１の発現を阻害する方法を提供する。
【００３３】
本発明は、アンチセンス化合物もしくはＲＮＡｉ化合物、またはリボザイムを使用して、インビボでのＯＡＳ１の特定の形態の発現を、減少させるかまたは増加させる方法を提

供し、このような形態は、ＮＴ＿００９７７５．１３の、位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における少なくとも１つの変異を有することによって定義される。

【００３４】

本発明は、インビボの癌細胞と、ヒトＯＡＳ１をコードする核酸分子に対して標的化された、８～３５ヌクレオチド長のアンチセンス化合物またはリボザイムとを接触させ、その結果、ヒトＯＡＳ１の発現が、阻害される工程を包含する、癌細胞の増殖を調節する方法をさらに提供する。

【００３５】

本発明は、ＯＡＳ１ポリヌクレオチドの標的領域を同定するための方法を、なおさらに提供する。本発明はまた、インサイチュハイブリダイゼーションによってＯＡＳ１ポリヌクレオチドを同定するための標識されたプローブを提供する。

【００３６】

本発明は、ＨＣＶ感染を防ぐかまたは阻害するための医薬を調製するための、本発明のＯＡＳ１インヒビターの使用を提供する。

【００３７】

本発明は、ＯＡＳ１タンパク質の特定領域に対してか、またはこのタンパク質の特定の機能にＯＡＳ１インヒビターを指向する工程を、さらに提供する。

【００３８】

本発明はまた、ＯＡＳ１の発現を阻害するための薬学的組成物を提供し、この組成物は、生理学的に受容可能なキャリアまたは生理学的に受容可能な希釈剤を含む混合物中に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する。

【００３９】

本発明は、ＯＡＳ１　ＲＮＡを特異的に切断し得るリボザイムおよびこのリボザイムを含有する薬学的組成物を、さらに提供する。

【００４０】

本発明はまた、ＯＡＳ１の小分子インヒビターを提供し、このインヒビターは、ＯＡＳ１の活性を減少し得るか、またはＯＡＳ１　ｍＲＮＡの発現を、減少し得るかもしくは阻害し得る。

【００４１】

本発明は、２’－５’オリゴアデニレートの合成以外のＯＡＳ１タンパク質の特定の機能を改変するＯＡＳ１のインヒビターを、さらに提供し、このような機能としては、他のタンパク質（例えば、Ｃ型肝炎ウイルスのＮＳ５Ａタンパク質）との相互作用が挙げられる。

【００４２】

本発明は、ＯＡＳ１の翻訳後修飾（グリコシル化およびホスホリル化が挙げられるが、これらに限定されない）を変化させる化合物を、さらに提供する。

【００４３】

本発明は、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子の変異を同定するための、ヒトの遺伝学的スクリーニング方法を、さらに提供し、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）増幅条件下で、ヒトから得たゲノムＤＮＡの試料を、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子の、ヌクレオチド位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８を含むヒトゲノムＤＮＡの領域を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）のプライマー対を用いて処理し、この領域を含む増幅産物を生成する工程；および（ｂ）ヌクレオチド位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１

０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８におけるヌクレオチドの点変異の存在を、工程（ａ）の増幅産物において検出し、それによってこの変異を同定する工程。

【００４４】

本方法の特定の実施形態において、上記領域は、配列番号１～配列番号７および配列番号５７～配列番号６４からなる群より選択される配列によって示されるヌクレオチド配列を含む。他の実施形態において、この領域は本質的に、配列番号１～配列番号７および配列番号５７～配列番号６４からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなる。ハイブリダイゼーション条件下で、上記点変異に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いて上記の工程（ａ）の増幅産物を処理する工程、およびハイブリダイゼーション産物の形成を検出する工程を包含する検出方法もまた、提供される。この方法の特定の実施形態において、このオリゴヌクレオチドプローブは、配列番号１２～配列番号１８からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００４５】

本発明はまた、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子（ＯＡＳ１）の、ヌクレオチド位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における、野生型ヌクレオチドに対する非野生型ヌクレオチドの置換を包含する点変異を含むＣ型肝炎感染抵抗性の疾患対立遺伝子を、ヒトにおいて検出するための方法に関し、この方法は、以下の工程を包含する：（ａ）ＰＣＲ緩衝液中で、上記ヒトから得たゲノムＤＮＡの試料と、配列番号８および配列番号９ならびに配列番号１０および配列番号１１からなる群より選択されるオリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子に特異的なＰＣＲプライマー対とを組み合わせることによってポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）混合物を形成する工程；（ｂ）このＰＣＲ混合物を、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子の増幅産物を生成するために複数回のＰＣＲの温度循環に供する工程；および（ｃ）ハイブリダイゼーション条件下で、配列番号１２～配列番号１８からなる群より選択されるプローブを用いて工程（ｂ）において生成された産物を処理し、それによってこの変異を検出する工程。

【００４６】

アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、小さな抑制性（ｓｍａｌｌ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ）ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）、タンパク質、ポリペプチド、抗体、および小分子からなる群より選択される単離されたＯＡＳ１インヒビターが、また提供される。この単離されたインヒビターは、配列番号１９の配列の少なくとも１５個の連続した核酸を含む、アンチセンス分子またはその相補体であり得る。他の実施形態において、この単離されたＯＡＳ１インヒビター（アンチセンス分子またはその相補体）は、高度にストリンジェントな条件下で、配列番号１９の配列にハイブリダイズする。

【００４７】

この単離されたＯＡＳ１インヒビターは、抗体および抗体フラグメントからなる群より選択され得る。薬学的に受容可能なキャリア中に治療有効量の少なくとも１つのＯＡＳ１インヒビターを含有する組成物がまた、提供される。

【００４８】

本発明はまた、哺乳動物細胞中のＯＡＳ１の発現を阻害する方法に関し、この方法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、タンパク質、ＲＮＡｉ、ペプチド、抗体、および小分子からなる群より選択されるＯＡＳ１インヒビターを、この細胞に投与する工程を包含する。

【００４９】

本発明は、被検体においてＯＡＳ１遺伝子発現の発現を阻害する方法に関し、この方法は、薬学的に有効なビヒクル中の、このＯＡＳ１遺伝子に由来する選択された標的核酸配列の全てまたは一部に対して特異的にハイブリダイズするのに有効である量のアンチセン

スオリゴヌクレオチドを、このヒト被検体に投与する工程を包含する。
【００５０】
本発明はなおさらに、感染に対して感受性のヒト被検体においてフラビウイルスによる感染を妨害する方法に関し、この方法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、ＲＮＡｉ、タンパク質、ポリペプチド、抗体、および小分子からなる群より選択されるＯＡＳ１インヒビターを、ヒト被検体に対して投与し、ここでこのＯＡＳ１インヒビターが、フラビウイルスによる感染を妨害する工程を包含する。
【００５１】
本発明はなおさらに、感染に対して感受性であるヒト被検体においてフラビウイルスまたは他のウイルスによる感染を、防ぐかまたは治癒する方法に関し、この方法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、ＲＮＡｉ、タンパク質、ポリペプチド、抗体、および小分子からなる群より選択されるＯＡＳ１インヒビターを、ヒト被検体に対して投与する工程を包含し、ここでこのＯＡＳ１インヒビターは、このフラビウイルスまたは他のウイルスによる感染を防ぎ、そしてここでこのＯＡＳ１インヒビターは、ＮＴ＿００９７７５．１３の位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における変異によって定義されるタンパク質の１つ以上の特定の形態に対して指向される。
【００５２】
本発明はなおさらに、以下の配列のポリペプチドの１つを投与することによって、感染に対して感受性のヒト被検体における、フラビウイルスまたは他のウイルスのいずれかによる感染を防ぐかまたは治癒する方法に関する：配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号４６、配列番号４７、および／または配列番号４８。
【００５３】
本発明はまた、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）による感染に対する処置を具体化する。
【００５４】
本発明はなおさらに、ヒト被検体においてインスリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）を防ぐ方法に関し、この方法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、ＲＮＡｉ、タンパク質、ポリペプチド、抗体、および小分子からなる群より選択されるＯＡＳ１インヒビターを、ヒト被検体に対して投与し、ここでこのＯＡＳ１インヒビターが、ＩＤＤＭを防ぐ工程を包含する。
【００５５】
本発明はなおさらに、ヒト被検体においてＩＤＤＭを防ぐ方法に関し、この方法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、ＲＮＡｉ、タンパク質、ポリペプチド、抗体、および小分子からなる群より選択されるＯＡＳ１インヒビターを、ヒト被検体に対して投与する工程を包含し、ここでこのＯＡＳ１インヒビターは、ＩＤＤＭを防ぎ、そしてこのＯＡＳ１インヒビターは、ＮＴ＿００９７７５．１３の、位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における変異によって定義されるタンパク質の、１つ以上の特定の形態に対して指向される。
【００５６】
本発明はなおさらに、癌（例えば、前立腺癌）を、ＯＡＳ１遺伝子の発現の増加によってか、または本明細書中に開示されるポリペプチドの治療的投与によって処置する方法に関する。
【００５７】

インビトロの細胞においてＯＡＳ１標的遺伝子の発現を阻害するための方法もまた提供され、この方法は、ＯＡＳ１標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な量での、リボ核酸（ＲＮＡ）の細胞中への導入を包含し、ここでこのＲＮＡは、本質的にＯＡＳ１標的遺伝子のヌクレオチド配列に対応するリボヌクレオチド配列からなる第１の鎖、および本質的にこのＯＡＳ１標的遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的なリボヌクレオチド配列からなる第２の鎖を有する２本鎖の分子であり、ここで第１のリボヌクレオチド鎖および第２のリボヌクレオチド鎖は、この２本鎖の分子を形成するために互いにハイブリダイズする、別々の相補的な鎖であり、この２本鎖の分子は、上記標的遺伝子の発現を阻害する。

【００５８】

本方法の特定の実施形態において、上記第１のリボヌクレオチド配列は、ＯＡＳ１標的遺伝子に対応する少なくとも２０個の塩基を含み、そして上記第２のリボヌクレオチド配列は、ＯＡＳ１標的遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的な少なくとも２０個の塩基を含む。なおさらなる実施形態において、この標的遺伝子の発現は、少なくとも１０％阻害される。

【００５９】

本方法のなおさらなる実施形態において、上記２本鎖のリボ核酸構造は、少なくとも２０塩基の長さであり、そしてリボ核酸鎖の各々は、少なくとも２０塩基にわたるＯＡＳ１標的遺伝子のデオキシリボ核酸鎖に対して特異的にハイブリダイズし得る。

【００６０】

本発明は、遺伝子変異に起因して減少するかまたは消失し得るＯＡＳ１の機能を回復し得る、ポリペプチドまたはタンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、このポリペプチドまたはタンパク質は、配列番号１９を含む遺伝子によってコードされる野生型ＯＡＳ１のアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、ＯＡＳ１遺伝子中の変異は、ＯＡＳ１タンパク質に、上昇した活性、上昇した安定性、および／または増加した半減期を与え、または抗ウイルス活性に、より適したＯＡＳ１タンパク質をなす他の変化を与える。上記変異したＯＡＳ１遺伝子によってコードされるタンパク質またはポリペプチドが、好ましい。

【００６１】

任意の上記のタンパク質および上記のポリペプチドは、治療用組成物の成分として提供され得る。

【００６２】

治療用組成物の成分として、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号４６、配列番号４７および／または配列番号４８からなるタンパク質のいずれかの使用もまた、提供される。

【００６３】

さらなる実施形態において、ＯＡＳ１タンパク質をコードする核酸、ＯＡＳ１変異タンパク質、またはＯＡＳ１ポリペプチドは、遺伝子治療の形態で投与され得る。

【図面の簡単な説明】

【００６４】

【図１－１】図１は、ＯＡＳ１遺伝子における本発明の変異の配置、対立遺伝子改変体（塩基の置換）、ゲノム配列上の変異の座標、およびＮＣＢＩ　ｄｂＳＮＰ番号（存在する場合）を示す表である。

【図１－２】図１－１の続き。

【図１－３】図１－２の続き。

【図１－４】図１－３の続き。

【図２－１】図２（配列番号１９）は、ＮＣＢＩ登録番号ＮＴ　００９７７５．１３の位置２，１３０，０００～２，１５７，９９９における連続したヌクレオチド塩基からなるポリヌクレオチド配列である。

【図２－２】図２－１の続き。
【図２－３】図２－２の続き。
【図２－４】図２－３の続き。
【図２－５】図２－４の続き。
【図２－６】図２－５の続き。
【図２－７】図２－６の続き。
【図２－８】図２－７の続き。
【図２－９】図２－８の続き。
【図３－１】図３は、配列番号２０～配列番号６４を示す。
【図３－２】図３－１の続き。
【図３－３】図３－２の続き。
【図３－４】図３－３の続き。
【図３－５】図３－４の続き。
【図３－６】図３－５の続き。
【図３－７】図３－６の続き。
【図３－８】図３－７の続き。
【図３－９】図３－８の続き。
【図３－１０】図３－９の続き。
【図３－１１】図３－１０の続き。
【図４】図４は、白色人種集団におけるＯＡＳ１遺伝子中の、近接したハプロタイプの分布を示す。
【図５Ａ】図５Ａおよび図５Ｂは、本発明によって開示される種々の転写改変体、および本発明によって開示される変異に対する関係を示す。図５Ａは、転写改変体（ＴＶ）形態１～６を示し、そして図５Ｂは、ＴＶ形態７～１０を示す。図５Ｃは、ヒトと比較した、チンパンジーの改変体およびゴリラの改変体の推測される構造を示す。
【図５Ｂ】図５Ａおよび図５Ｂは、本発明によって開示される種々の転写改変体、および本発明によって開示される変異に対する関係を示す。図５Ａは、転写改変体（ＴＶ）形態１～６を示し、そして図５Ｂは、ＴＶ形態７～１０を示す。図５Ｃは、ヒトと比較した、チンパンジーの改変体およびゴリラの改変体の推測される構造を示す。
【図５Ｃ】図５Ａおよび図５Ｂは、本発明によって開示される種々の転写改変体、および本発明によって開示される変異に対する関係を示す。図５Ａは、転写改変体（ＴＶ）形態１～６を示し、そして図５Ｂは、ＴＶ形態７～１０を示す。図５Ｃは、ヒトと比較した、チンパンジーの改変体およびゴリラの改変体の推測される構造を示す。
【図６】図６は、ヒトと比較したＯＡＳ１遺伝子における非ヒト霊長類の変異および対応するヒトゲノム配列における変異の座標を記載する表である。
【図７】図７は、Ｅ．ｃｏｌｉにより発現され、そして回収された場合の、本発明の例示的なポリペプチドの酵素活性を実証する。
【図８】図８は、ＨｅＬａ細胞中で発現された場合の、本発明のポリヌクレオチドから生じる例示的なポリペプチドの酵素活性を実証する。
【図９】図９は、本発明の例示的なポリペプチドに対する抗体の発生を実証する。
【図１０】図１０は、例示的なタンパク質変換ドメインポリペプチドを詳述する表である。

【００６５】
（発明の詳細な説明）
（導入および定義）
本発明は、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子における新規な変異、ウイルス感染についての疑いの診断または、ウイルス感染に対する抵抗性の診断のためのこれらの変異の使用、本発明の変異を有する遺伝子によってコードされるタンパク質、ならびにこのタンパク質、抗体および関連する核酸を使用するウイルス感染の防御または阻害に関する。これらの変異は、フラビウイルス（特に、Ｃ型肝炎ウイルス）による感染に対するキャリ

アの抵抗性に相関する。

【００６６】

現存の医学的調査の多くは、疾患を生じるかまたは疾患に寄与する変異および欠失を同定することが中心である。このような調査は、疾患の状態に合わせた処置の、化合物および方法を導くために計画される。感染因子および他の危険因子に対する曝露にもかかわらず人々に健康を維持させる遺伝子の影響を研究することは、あまり注目を集めていなかった。本発明は、疾患に対する抵抗性を与える遺伝子の変化または遺伝子変異を発見するために、ヒト被検体の特定の集団を確認しそして分析することによって、本発明者らにより開発されたプロセスの成功した適用を示す。特定の疾患または生物学的状態に対して天然の抵抗性を有する一部の集団区分はさらに、薬学的な介入、診断的評価、または予防用ワクチンのような予防に関する適切な標的である遺伝子およびタンパク質の同定を可能にする。

【００６７】

本明細書中で特定されるこの一部の集団区分は、コホート（ｃｏｈｏｒｔ）が、感染している（血清陽性）一方で、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）に対する度重なる曝露にもかかわらず、血清陰性を維持する個体で構成される。研究された集団は、度重なる輸血に供される血友病患者、および使い回しの針および他の危険因子に曝される静脈内用薬物の使用者を含んだ。

【００６８】

ＨＣＶ感染は、タンパク質および免疫系の構成要素の複雑な組み合わせを伴い、これらの構成要素は、一緒になって働いて疾患を生じる一方で、感染細胞中にウイルスの低い定常状態を生じ得る感染のレベルをもたらし、このことはＨＣＶを宿主免疫の監視システムから明らかに逃れさせ、一方で持続的なウイルス感染を可能にする。（Ｄａｎｓａｋｏら、Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　９７：１７－３０，２００３）。本発明は、このシステムの１つの構成要素（インターフェロン誘導性の２’－５’－オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子（具体的には、ＯＡＳ１））に焦点をあてる。このＯＡＳ１遺伝子は、ウイルスＲＮＡを切断するリボヌクレアーゼＬ（ＲＮａｓｅ　Ｌ）を活性化することによって、ヒトにおける宿主細胞の抗ウイルス活性において重要な役割を果たす。ＨＣＶのＲＮＡは、この２’－５’－ＯＡＳ／ＲＮａｓｅ　Ｌ経路を活性化する。Ｄａｎｓａｋｏらが指摘するように、ウイルスＲＮＡの切断を生じる経路を活性化することはＨＣＶのＲＮＡにとって矛盾するようにみえるだろう。しかし、このような活性は、宿主の免疫防御と宿主を殺傷し得る感染のレベルとの間の平衡を維持するように作用し得る。

【００６９】

ＯＡＳ１遺伝子のこの複雑な役割に照らして、本発明が、これらの変異のキャリアにおいて、ＯＡＳ１遺伝子中の変異とＨＣＶ感染に対する抵抗性との間の強い相関関係を同定したことは、非常に興味深い。ここで、このような個体の存在は、感染レベルのウイルスに対する曝露を繰り返すにもかかわらずＨＣＶ感染に対して抵抗性であることに対して、ＯＡＳ１がどのように寄与するのかの解明を可能にする。次いで、この情報は、天然の抵抗性を欠く個体において、この抵抗性の機構を再現するための、方法および組成物の開発を導く。

【００７０】

したがって、本発明は、上記機構に関係なく、本明細書中で同定される変異が、ＨＣＶ感染に対して抵抗性である個体を特定するために有用であることを提供する。この抵抗性は、ＯＡＳ１タンパク質の機能に損失を通して生じ得、この場合、ＨＣＶウイルスのレベルは、このウイルスが宿主免疫の監視システムから逃れるのを防ぎ、したがって、このウイルスの破壊を促進するのに、非常に十分であると予測される。この抵抗性はまた、ＯＡＳ１タンパク質レベルが上昇し、このタンパク質の半減期は上昇し、そして／またはこのタンパク質の構造はある意味、ウイルスＲＮＡを切断するリボヌクレアーゼＬを活性化する能力を向上させることに影響するという機能の獲得を生じる。この抵抗性はまた、ＨＣＶウイルスタンパク質またはＨＣＶウイルスヌクレオチドによる正常なＯＡＳ１タンパク

質の機能の阻害を防ぐ、ＯＡＳ１タンパク質に対する修飾を通して生じ得る。この抵抗性はまた、ＯＡＳ１タンパク質と、通常のＨＣＶウイルスの生存期間に必要なＨＣＶウイルスタンパク質またはＨＣＶウイルスヌクレオチドとの相互作用を妨害する、ＯＡＳ１タンパク質に対する修飾を通して生じ得る。本発明は、１つの機構に限られない。さらに、数種の異なる点変異が、本明細書中に開示さる。このことは、各変異がＯＡＳ１タンパク質の構造または機能に対して同じ効果を有するということを示すということを意図されない。

【００７１】

ＯＡＳ１は、ＨＣＶがメンバーであるフラビウイルスファミリーの他のウイルスによる感染において作用する。このフラビウイルスファミリーはとしてはまた、黄熱病、デング熱、セントルイス脳炎、日本脳炎、および本明細書中に開示される他のウイルス性疾患を引き起こすウイルスが挙げられる。これらのウイルスに対する上記宿主の防御としては、ウイルス誘導性インターフェロンが挙げられる。このインターフェロンとしては、２’－５’－オリゴアデニレートシンセターゼが挙げられ、２’－５’－オリゴアデニレートシンセターゼは、上で議論されるように、ＲＮａｓｅＬの活性化に関する。次に、ＲＮａｓｅＬは、ウイルスＲＮＡを切断する。本明細書中に開示される方法による防御および／または阻害に従う他のウイルス感染としては、ＲＳＶが挙げられ得る。

【００７２】

詳細な説明および好ましい実施形態についての参照において、以下の定義が、使用される：

Ａ：アデニン；Ｃ：シトシン；Ｇ：グアニン；Ｔ：チミン（ＤＮＡにおいて）；およびＵ：ウラシル（ＲＮＡにおいて）。

【００７３】

対立遺伝子：特定の遺伝子のＤＮＡ配列の改変体。二倍体の細胞において、２つの対立遺伝子（各々一対の染色体の相同的染色体上の同じ相対的位置または相対的遺伝子座にある）の最大値が存在する。任意の１つの遺伝子座における対立遺伝子が、同一である場合、この個体は、その遺伝子座に関してホモ接合的であるといい、そしてこれらが異なる場合、その個体は、この遺伝子座に関して異種接合的であるという。任意の１つの遺伝子の異なる対立遺伝子が、単一の塩基のみによって変化し得ることに起因して、任意の１つの遺伝子に対する対立遺伝子のあり得る数は、非常に多い。対立遺伝子が異なるとき、多くの場合、一方は、他方（劣性であるという）に対して優性である。優性は、表現型の特性であり、そして優勢な遺伝子による劣勢対立遺伝子の不活性化を意味しない。多くの例において、正常に機能する（野生型の）対立遺伝子は、いくぶん不完全な機能の変異対立遺伝子の全てに対して優勢である。このような場合における一般的な説明は、２つのうち１つの機能的な対立遺伝子は、生物の正常な発達を支援する、十分に活性な遺伝子産物を産生するのに十分である（すなわち、遺伝子産物の量において、通常、２倍の安全域が存在する）。

【００７４】

ハプロタイプ：多くの存在し得る複数の対立遺伝子の一方（染色体の位置確認および一組の染色体の１つの特定の相同染色体によって保有される対立遺伝子の組を示すことによって連続的に順序付けられる）。

【００７５】

ヌクレオチド：糖部分（ペントース）、リン酸、および窒素性の複素環式塩基からなるＤＮＡまたはＲＮＡのモノマー単位。塩基は、グリコシドの炭素（ペントースの１’炭素）を介して糖部分に結合され、そして塩基と糖との組み合わせは、ヌクレオシドである。このヌクレオシドが、ペントースの３’位または５’位に対して結合されたリン酸基を含む場合に、これは、ヌクレオチドと称される。作動可能に結合されたヌクレオチドの配列は代表的には、本明細書中で「塩基配列」または「ヌクレオチド配列」と称され、そしてこれらの文法的な等価物を指し、これらは本明細書中で、左から右への方向性が、慣習的に５’末端から３’末端への方向である式によって示される。

【００７６】
塩基対（ｂｐ）：２本鎖ＤＮＡ分子における、アデニン（Ａ）とチミン（Ｔ）との協調、またはシトシン（Ｃ）とグアニン（Ｇ）との協調。ＲＮＡにおいては、ウラシル（Ｕ）が、チミンに対して置き換えられる。本明細書中でＲＮＡを指す場合、記号Ｔは、ＲＮＡ分子の特定の位置におけるウラシルを示すＵと、交換可能に使用され得る。
【００７７】
核酸：ヌクレオチドのポリマー（１本鎖または２本鎖のいずれか）。
【００７８】
ポリヌクレオチド：１本鎖ヌクレオチドまたは２本鎖ヌクレオチドのポリマー。本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」およびその文法的等価物は、核酸の全範囲を含む。ポリヌクレオチドとは、代表的に、直鎖状の２つ以上のデオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドで構成される核酸分子を指す。この正確な大きさは、多くの要因に依存し、そして、この要因は、当該分野において周知である最終的な使用条件に依存する。本発明のポリヌクレオチドとしては、プライマー、プローブ、ＲＮＡ／ＤＮＡセグメント、オリゴヌクレオチドまたは「オリゴ」（比較的に短いポリヌクレオチド）、遺伝子、ベクター、プラスミドなどが挙げられる。
【００７９】
ＲＮＡｉ：ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、小さな干渉するＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）（代表的に、約２１～２３ヌクレオチド長の２重鎖）が、細胞中に導入される方法であり、これは最終的に、同一配列または相補的配列を含む標的化された遺伝子のメッセンジャーＲＮＡの分解を生じ、そしてこの遺伝子を有効にサイレンシングする。
【００８０】
遺伝子：ヌクレオチド配列が、ＲＮＡまたはポリペプチドについてコードする核酸。遺伝子は、ＲＮＡまたはＤＮＡのいずれかであり得る。
【００８１】
２重鎖ＤＮＡ：２重鎖の塩基対に存在する相補的塩基の各々の間の１つ以上の水素結合によって、一つに保たれる実質的に相補的なポリヌクレオチドの２本鎖を含む２本鎖の核酸分子。塩基対を形成するヌクレオチドは、リボヌクレオチド塩基またはデオキシリボヌクレオチド塩基のいずれかであり得、語句「２重鎖ＤＮＡ」とは、２つのＤＮＡ鎖を含むＤＮＡ－ＤＮＡの２本鎖（ｄｓ　ＤＮＡ）、または１つのＤＮＡ鎖および１つのＲＮＡ鎖を含むＲＮＡ－ＤＮＡの２本鎖のいずれかをいう。
【００８２】
相補的塩基：ＤＮＡまたはＲＮＡが、２本鎖構造をとる場合に、通常対となるヌクレオチド。
【００８３】
相補的ヌクレオチド配列：結果的な水素結合によって別の１本鎖上のヌクレオチド配列に対して特異的にハイブリダイズするのに十分に相補的である、ＤＮＡまたはＲＮＡの１本鎖分子中のヌクレオチドの配列。
【００８４】
保存的：前もって選択された（参照）配列が、その前もって選択された配列の正確な相補体に対して無作為でなくハイブリダイズする場合、ヌクレオチド配列は、前もって選択された配列について保存的。
【００８５】
ハイブリダイゼーション：相補的塩基対の間の水素結合の確立によって、２重鎖またはヘテロ２本鎖を形成する実質的に相補的なヌクレオチド配列（核酸の鎖）の塩基対形成。それは、特異的である（すなわち、競合的に阻害され得る２つの相補的ポリヌクレオチド間の無作為ではない相互作用）。
【００８６】
ヌクレオチドアナログ：Ａ、Ｔ、Ｇ、ＣまたはＵとは構造的に異なるが、核酸分子における通常のヌクレオチドを置換するのに十分に類似している、プリンヌクレオチドまたは

ピリミジンヌクレオチド。
【００８７】
ＤＮＡホモログ：前もって選択され、保存されたヌクレオチド配列を有する核酸、および前もって選択されたリガンドを結合し得るレセプターについてコードする配列。
【００８８】
上流：ＤＮＡ転写の方向に対向する方向であり、したがって、非コード鎖上の５’から３’にか、またはｍＲＮＡ上の３’から５’に向かう方向。
【００８９】
下流：やはりＤＮＡ配列に関してＤＮＡの非コード鎖に沿った３’方向から５’方向、またはＲＮＡ転写物に沿って５’方向から３’方向に向かう、配列の転写または配列の読み出しの方向。
【００９０】
終止コドン：アミノ酸をコードせず、代わりにタンパク質合成の停止を生じる３つのコドンのいずれか。これらは、ＵＡＧ、ＵＡＡおよびＵＧＡであり、そしてまた、ナンセンスコドンまたは停止コドンと称される。
【００９１】
リーディングフレーム：翻訳に使用される連続する３連のヌクレオチド（コドン）の特定の配列。このリーディングフレームは、転写開始コドンの配置に依存する。
【００９２】
イントロン：介在配列とも称され、初めはＲＮＡ中に複製されるが、最終的なＲＮＡ転写物においては切り出される、ＤＮＡの非コード配列。
【発明を実施するための形態】
【００９３】
（発明を実施するための形態）
本発明は、フラビウイルス（特に、Ｃ型肝炎ウイルス）による感染に対する抵抗性に関するオリゴアデニレートシンセターゼ対立遺伝子についてヒトをスクリーニングするための新規な方法を提供する。本発明は、このような抵抗性が、ヒトＯＡＳ１遺伝子をコードするＧｅｎｂａｎｋ登録番号ＮＴ＿００９７７５．１３（配列番号１９）の、ヌクレオチド位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８におけるオリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子のＤＮＡ配列中の点変異（塩基置換）に関するという発見に基づく。
【００９４】
本発明は、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）による感染に対して抵抗性であるか、または一部抵抗性である被検体の集団を特定した研究結果、およびこの有益な効果を与える遺伝子の変異をさらに同定した研究結果を開示する。２’－５’－オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子中の数種の遺伝子変異が同定され、これらは、ＨＣＶ感染に対する抵抗性に大きく関連する。使用された研究計画は、事例－対照対立遺伝子関連分析であった。事例は、連続的にＨＣＶに対する曝露を実証されたかまたは推定され、しかしこのウイルスに対する抗体の発生によって実証されるような感染を発症しなかった（すなわち、ＨＣＶ血清陰性）被検体として与えられた。対照の被検体は、ＨＣＶ陽性に血清型が変化した、連続的に曝された被検体であった。事例の被検体および対照の被検体は、３つの集団（カナダのブリティッシュコロンビア州のバンクーバーからの血友病患者；北西フランスからの血友病患者；およびシアトル大都市圏からの注射薬物使用者）から募られた。
【００９５】
事例の定義および対照の定義は、血友病の群とＩＤＵの群との間で異なり、そしてそれらは、本明細書中に記載されるような、文献において公開される感染危険率の疫学的なモデルおよび本発明者らによって開発された他のモデルに基づく。血友病の集団に関して、対照の被検体は、市販の診断用研究試験を用いて、ＨＣＶに対する抗体について陽性であ

ることが実証された。事例の被検体は、ＨＣＶ血清陰性であり、５％未満の正常な凝固因子を有し、そして１９８７年１月より前に濃縮凝固因子を投与されたことが実証された。対照の注射薬物使用者は、ＨＣＶ血清陽性実証済みとして定義された。事例の注射薬物使用者は、ＨＣＶ血清陰性実証済みであり、１０年間より長く、薬物を注射しており、そして１つ以上のさらなる危険行為に関与していることが報告されているものとして定義された。さらなる危険行為としては、注射器、調理器、または綿を別のＩＤＵと共有することが挙げられる。１つの特定の白色人種集団において、２０の事例および４２の対照が、この研究に含まれた。事例の被検体およびコントロールの被検体の選択は、基本的に、危険に冒された（「対照」）個体群および危険に冒されていない（「事例」）個体群を用いて米国特許出願第０９／７０７，５７６号に記載される通りに行われた。

【００９６】

ＨＣＶ感染に対する抵抗性に関わる遺伝子変異を同定することについての本発明のアプローチは、候補遺伝子の選択を包含する。細胞表面に対するウイルスの結合、細胞内でのウイルスの増殖、インターフェロン応答、ならびに先天性免疫系および抗ウイルス応答の局面に関係する約５０個の候補遺伝子が、データベース検索された。候補遺伝子は、各被検体のゲノムＤＮＡからの標的配列を増幅するポリメラーゼ連鎖反応を使用して、事例および対照において配列決定された。候補遺伝子から得たＰＣＲ産物は、自動化された蛍光ベースのＤＮＡ配列決定およびＡＢＩ３７３０自動シークエンサーを使用して直接的に配列決定された。

【００９７】

ゲノムの変異は、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子（ＯＡＳ１）において、単独かまたは組み合わせで同定され、ＨＣＶ感染に対する抵抗性に有意（ｐ＜０．０５）に関連した。これらの変異を構成する塩基置換および塩基欠失は、図１に示される。ＯＡＳ１遺伝子の改変体形態（「ＯＡＳ１Ｒ」）は、１つ以上の本発明の変異の存在によって形成される（配列番号１～配列番号７および配列番号５７～配列番号６４として同定される）。ＯＡＳ１遺伝子のこれらの改変体ＯＡＳ１Ｒ形態は、ウイルス感染に対する抵抗性を与えると考えられる。

【００９８】

複数のＯＡＳ１変異（配列番号１～配列番号７および配列番号５７～配列番号６４）を含む集団の親ハプロタイプおよび被検体の親ハプロタイプは、当業者に公知のＥｘｐｅｃｔａｔｉｏｎ　Ｍａｘｉｍａｔｉｏｎ法（ＥｘｃｏｆｆｉｅｒおよびＳｌａｔｋｉｎ，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｅｖｏｌ．１２：９２１－９２７，１９９５）によって設定される、事例－対照の遺伝子型データから、計算により推測される。本発明は、ハプロタイプの分析のためのＯＡＳ１変異の全範囲の使用ならびに計算の便宜のためのＯＡＳ１変異のサブセットの使用の両方を包含する。事例群および対照群を用いたハプロタイプおよびハプロタイプサブセットの分離の様式の比較分析は、ウイルス抵抗性またはウイルス感受性に対する特定の効力の変異を同定する。

【００９９】

１つの例示的な例において、ハプロタイプは、配列番号２～配列番号６によって同定される、複数のＯＡＳ１変異の含有について計算される。数種のハプロタイプが、この分析によって白色人種の事例集団および白色人種の対照集団において同定される。これらのハプロタイプの定義は、図４に示される。２つの共通するハプロタイプ（ＨＡＰ１およびＨＡＰ２として同定される）が同定され、これらは、推測されたハプロタイプの約８５％を説明し、そしてハーディーヴァインベルク平衡にある（特に、この集団中のハプロタイプホモ接合体の出現に対して）。種々のヒト集団および霊長類におけるＯＡＳ１のさらなる分析は、ＨＡＰ２が、旧世界ザルおよび原人の分岐点にさかのぼる、祖先の霊長類ハプロタイプであることを示す。１つのさらなるハプロタイプ（ＨＡＰ３として同定される）は、この特定の集団中の、持続的にＨＣＶ抵抗性である事例群に関連する。したがって、ＨＡＰ３ハプロタイプを保有する被検体は実質的に、ＨＣＶ感染の危険がより低い。ＨＡＰ３ハプロタイプは、祖先のハプロタイプが起源とする、複雑な一連の組換えおよび変異を

通じて生じたようである。このような事象の組み合わせの稀少性は、ハプロタイプＨＡＰ３の多くの出現と組み合わせて、おそらく長期にわたるウイルス負荷の繰り返しに対する応答として、この集団中のハプロタイプＨＡＰ３を発生しかつ維持するように作用した正の選択を示唆する。この例において、ハプロタイプＨＡＰ３は、単一の前駆体ＲＮＡにおいて、配列番号２の変異におけるＧヌクレオチドの効果を配列番号４の変異におけるＡヌクレオチドの効果と一緒に組み合わせる、かなりの集団頻度にて出現する唯一のハプロタイプである。

【０１００】

本発明は、上記の説明的な例に限定されない。特定のＯＡＳ１変異の関連性および有用性に対する見識を与える他の説明的な例によっても、本発明は限定されない。別の説明的な例において、配列番号２におけるＡヌクレオチドに対するＧヌクレオチドの置換は、セリンからグリシンへの予測されるアミノ酸置換を生じる。当業者にとって公知である計算的予測は、セリンが、ホスホリル化の部位であり、一方グリシンは、ホスホリル化されないということを強く示唆する。

【０１０１】

さらなる説明的な例において、配列番号４の変異におけるＧヌクレオチドに対するＡヌクレオチドの置換は、ＯＡＳ１において、野生型の６番目のエキソンに関する共通スプライシングアクセプター部位（ｃｏｎｓｅｎｓｕｓ ｓｐｌｉｃｅ ａｃｃｅｐｔｏｒ ｓｉｔｅ）中に生じる。この置換は、このスプライシングアクセプター認識シグナルにおいてこの必要なＧを置き換えるが、このプロセスは、１塩基対下流の新しいスプライシング認識部位を生じる。したがって、この変異形態は、この翻訳タンパク質におけるフレームシフトを形成する。この変異部位はまた、効果の弱いスプライシングシグナルであり、そして結果として、このフレームシフトされたエキソン６のスプライシングに加えて、前駆体ＲＮＡのさらなる代替的なスプライシングを促す。これらの代替的なスプライシング形態の好ましい実施形態は、図５Ａおよび図５Ｂにおいて提供される。遺伝的分析のさらなる例示的な例は、以下に提供される。

【０１０２】

ＯＡＳ１転写改変体の無差別なスプライシングは独立して、リンパ球細胞株および新鮮なヒト血清から単離される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の両方に由来するＲＮＡの逆転写によって確認される。種々の、ハプロタイプ保有細胞株およびハプロタイプ保有ＰＢＭＣから得た逆転写されたＲＮＡ産物のＰＣＲ分析は、ＯＡＳ１Ｒ形態の多数の転写改変体において生じる、配列番号４の変異に関するＡヌクレオチドを保有するＲＮＡ形態を示した。これらのＯＡＳ１Ｒ転写改変体は、図５Ａおよび図５Ｂにグラフで示され、そして図３において提供されるような配列番号３６～配列番号４７を含む。

【０１０３】

このＯＡＳ１遺伝子のこれらの改変ＯＡＳ１Ｒ形態および対応する転写改変体は、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３２、配列番号３５、配列番号４６、および／または配列番号４７からなる１つ以上のポリペプチドをコードすると考えられる。上記のポリペプチドは、単数または複数のいずれかで、本明細書中において交換可能に、ＯＡＳ１Ｒポリペプチドまたはタンパク質と称され得る。上記のポリペプチドの多くの一般的な特徴は、これらが主に、そのアミノ末端部分を保存する一方で、そのカルボキシル末端部分において異なることである。

【０１０４】

代替的な転写物それ自体の産生に加え、この遺伝子のＯＡＳ１Ｒ形態はまた、特定の転写改変体についての選択的な優先度を改変する、特定の配列コンテキスト（ｃｏｎｔｅｘｔ）（例えば、エキソンスプライシングのエンハンサー）を含んでも失くしていてもよい。そして、このことは、生じるタンパク質の発生量の種々の相対的レベルを生じ得る。このＯＡＳ１遺伝子のこれらの改変ＯＡＳ１Ｒ形態はまた、生じるタンパク質の局在または翻訳後修飾を改変し得る。当業者は、特定のＯＡＳ１タンパク質形態の活性、安定性、も

しくは利用能を改良する、発生量の増加または他の修飾が、２’－５’－ＯＡＳ／ＲＮａｓｅ　Ｌ経路の抗ウイルス性能全体を改良し得ることを理解する。同様に、当業者は、特定のＯＡＳ１形態の活性または利用能を低下させることもまた、この特定のタンパク質が、他の特定のＯＡＳ１形態に対して有利でないかまたは不利でさえある事例において、２’－５’－ＯＡＳ／ＲＮａｓｅ　Ｌ経路の抗ウイルス性能全体を改良することを理解し得る。不利なＯＡＳ１タンパク質の１つの実施形態は、この特定のＯＡＳ１タンパク質の酵素活性を妨げるような様式でウイルスタンパク質によって特異的に標的化されるタンパク質であるが、これに限定されない。有利でないＯＡＳ１タンパク質のさらなる実施形態は、他の活性形態と重合し、それによってこの重合されたタンパク質の酵素活性全体を低下させるかまたは排除する（したがって、抗ウイルス効果全体を減少させる）より低い酵素活性を有するタンパク質である。１つ以上の上記の機構は、ウイルス感染に対する抵抗性に寄与し得る。しかし、本発明は、開示された改変ポリヌクレオチドまたは改変ポリペプチドの作用の特定の機構に限定されない。

【０１０５】

したがって、本発明は、ヒト２’－５’－オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子の新規な形態、新規なｍＲＮＡ転写物、および関連するタンパク質を提供する。本発明はまた、この新規なｍＲＮＡ転写物および新規なタンパク質に関する有用性を開示する。これらの新規な形態は、公のデータベース中に開示されない、数種の稀な遺伝子変異またはハプロタイプの１つ以上を有する遺伝子の存在によって特徴付けられる。ＯＡＳ１のこれらの新規な形態（ＯＡＳ１Ｒ）は、Ｃ型肝炎ウイルスおよび関連するフラビウイルス（西ナイルウイルス、デング熱ウイルス、黄熱病ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マリーバレーウイルス、ポーワッサンウイルス、ロシオウイルス、跳躍病ウイルス、バンジ（Ｂａｎｚｉ）ウイルス、イルヘウスウイルス、ココベラ（Ｋｏｋｏｂｅｒａ）ウイルス、クンジンウイルス、アルフイ（Ａｌｆｕｙ）ウイルス、ウシ下痢症ウイルス、およびキャサヌール森林病ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない）に対するあるレベルの抵抗性を、キャリアに与える。このＯＡＳタンパク質はまた、実験的なＲＳウイルスおよびピコルナウイルスの細胞培養感染システムにおける感染を減弱するのに重要であることが示された。ウイルスを放出するヒト免疫不全ウイルス－１（ＨＩＶ－１）感染細胞の不全は、高濃度のＯＡＳおよび／または２－５Ａに相関した。さらに、ＨＩＶ－１トランス活性化因子タンパク質（ｔａｔ）は、ＯＡＳの活性化を遮断することが示され（Ｍｕｌｌｅｒら，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．１９９０年５月５日；２６５（７）：３８０３－８）、したがってこのことは、ＯＡＳの新規な形態が、ＨＩＶ－１の防御機構を回避し、そして有効な治療を提供し得ることを示す。したがって、本明細書中に開示されるＯＡＳ１のこれらのＯＡＳ１Ｒ形態は、これらの非フラビウイルスの感染性因子に対する抵抗性を与え得る。

【０１０６】

本発明はまた、ＯＡＳ１のチンパンジー（Ｐａｎ　ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ）形態およびゴリラ（Ｇｏｒｉｌｌａ　ｇｏｒｉｌｌａ）形態（それぞれ、有用性を有する新規なｍＲＮＡおよび新規なポリペプチドを生じる）の新規な記載を提供する。遺伝子は代表的に、近縁関係にある霊長類（例えば、ヒト、チンパンジーおよびゴリラ）において非常に高度に保存されているが、ＯＡＳ１における重要な違いが、この３つの種の間で観察される。最もヒトに近縁であるチンパンジーは、切断されたタンパク質産物を生じるＯＡＳ１エキソン５内の１塩基置換（ヒトにおけるＮＴ＿００９７７５．１３中の２，１４２，３５１に対して等価な部位における置換であり、そして配列番号５３によって定義される）を有する。このチンパンジーの、ＯＡＳ１ポリペプチド配列およびＯＡＳ１　ｍＲＮＡ配列は、それぞれ、配列番号５１および配列番号５５によって提供される。ゴリラもまた、翻訳の早期の停止を生じるエキソン６内のアクセプタースプライシング部位近傍の２塩基対欠失（ヒトにおけるＮＴ＿００９７７５．１３中の２，１４４，０８９～２，１４４，０９０に対して等価な部位における欠失であり、そして配列番号５４によって定義される）を有する。このゴリラの、部分的ポリペプチド配列および部分的ｍＲＮＡ配列は、それぞ

れ、配列番号５２および配列番号５６によって提供される。ヒトと比較したこのチンパンジー転写物およびゴリラ転写物の推測される構造は、図５Ｃにおいて提供される。ヒトＯＡＳ１Ｒポリペプチドのように、これらの事例の各々は、そのカルボキシル末端尾部の構造および内容において最も著しく異なる、高度に保存されたポリペプチド配列を有する。これらのポリペプチドの共通のアミノ末端部分は、ＯＡＳ１酵素活性に必要とされることがこれまでに実証された要素の全てを含む。チンパンジーおよびゴリラが、アフリカにおけるヒトのウイルス負荷と同様のウイルス負荷に供されるので、これらの、異なるが機能的に類似する霊長類の改変体の有病率は、より長いＯＡＳ１形態のカルボキシ末端部分が、ウイルス負荷に対して生き残ることにおいて、不必要であるかまたは不利でさえあるという証拠を、さらに提供する。チンパンジーが、ヒトにおける転写改変体の異質性とは対照的にＯＡＳ１ポリペプチドの明らかな短縮を有するという事実は、チンパンジー（ＨＣＶ感染に対して感受性であることが知られる唯一の他の霊長類）が、ウイルスクリアランスの高い頻度、および感染の結果として生じる線維症または肝細胞癌の欠如によって特徴付けられる、ヒトと比較して異型の感染を有するという知見と一致する。

【０１０７】

それぞれの新規なＯＡＳ１Ｒ　ｃＤＮＡは、これらの変異のキャリアであるヒト被検体からクローニングされる。クローニングは、細胞または組織からのＲＮＡの単離、ＲＮＡからｃＤＮＡへの変換、およびｃＤＮＡからクローニングに適した２本鎖ＤＮＡへの変換を包含する標準的なｃＤＮＡクローニング法によって行われる。当業者が認識するように、これらの工程の全ては、慣習的な分子生物学的分析である。他の方法としては、逆転写ＰＣＲ、５’ＲＡＣＥ（ｃＤＮＡ末端の迅速増幅（Ｒａｐｉｄ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｃＤＮＡ　Ｅｎｄｓ））、または従来のｃＤＮＡライブラリーの構築およびサザンハイブリダイゼーションによるスクリーニングが挙げられる。本明細書中に記載される全てのＯＡＳ１Ｒ対立遺伝子は、キャリアの患者から回収される。新たにクローニングされたＯＡＳ１Ｒ　ｃＤＮＡの各々は、野生型に対するその同一性を確認するため、および野生型に対する任意のさらなる配列の違いを同定するために配列決定される。

【０１０８】

新規なＯＡＳ１Ｒ遺伝子変異は、生じるＯＡＳ１　ｍＲＮＡの特性を改変することによってウイルス感染に対する抵抗性に影響し得る。したがって、ＯＡＳ１Ｒ対立遺伝子のキャリアとホモ接合野生型の被検体との間のｍＲＮＡ安定性における違いが、評価される。ＲＮＡ安定性は、Ｔａｑｍａｎ（登録商標）および単純なノーザンハイブリダイゼーションを含む公知のアッセイを使用して評価され、そして比較される。これらは、分子生物学における慣習的な方法である。

【０１０９】

ＯＡＳ１Ｒ変異は、上記ＯＡＳ１遺伝子の調節を改変することによって感染抵抗性に影響する。ＯＡＳ遺伝子の発現が、インターフェロン処置により、およびウイルス感染の間に誘導されることは、公知である。上記ＯＡＳ１Ｒ対立遺伝子は、構成的な発現、過剰発現、または他の無調節性の発現を通じてウイルス感染に対する抵抗性を与え得る。数種の方法は、インターフェロンの刺激またはウイルスの刺激を伴う遺伝子発現およびそれを伴わない遺伝子発現を評価するために使用される。これらの方法としては、発現のマイクロアレイ分析、ノーザンハイブリダイゼーション、Ｔａｑｍａｎ（登録商標）などが挙げられる。試料は、末梢血単核細胞のようなＯＡＳ遺伝子を発現することが知られている組織から収集される。ＯＡＳ１Ｒキャリアから得た組織と、非ＯＡＳ１Ｒキャリアから得た組織との間で比較される。１つの実施形態において、末梢血単核細胞は、キャリアおよび非キャリアから収集され、培養によって増殖され、そしてインターフェロンによって刺激される。インターフェロン誘導の間のＯＡＳ１Ｒ対立遺伝子の発現レベルは、野生型対立遺伝子と比較される。別の実施形態において、ヒト被検体は、インターフェロンによって処置され、そしてＯＡＳ１遺伝子の誘導のレベルは、上記ＯＡＳ１Ｒ変異のキャリア　対　非キャリアで評価される。当業者が理解し得るように、組織、実験設計、および分析の方法の多くの組み合わせが、ＯＡＳ１Ｒ遺伝子調節を評価するために使用される。

【０１１０】
一旦、各ＯＡＳ１Ｒについての新規なｃＤＮＡが、クローニングされると、それは、多くの異なる公知の発現クローニングシステムのいずれかを使用して、組換えＯＡＳ１Ｒを生産するために使用される。このアプローチの１つの実施形態において、ＯＡＳ１Ｒ　ｃＤＮＡは、標準的な分子生物学的方法によって、ポリヒスチジンポリペプチドをコードするＤＮＡの配列を含むエピトープタグに隣接する、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ発現ベクター中にクローニングされる。その後、この組換えタンパク質は、固定化した金属アフィニティークロマトグラフィーまたは類似の方法を使用して、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ溶解物から精製される。当業者は、組換えタンパク質を精製するために使用され得る多くの異なる発現ベクターおよび宿主細胞（酵母発現系、バキュロウイルス発現系、チャイニーズハムスター卵巣細胞などが挙げられるが、これらに限定されない）が存在することを認識する。
【０１１１】
計算的方法は、ＯＡＳ１Ｒタンパク質を野生型ＯＡＳ１タンパク質から一意的に区別する、ＯＡＳ１Ｒタンパク質に由来する短いペプチド配列を同定するために使用される。種々の計算的方法および市販のソフトウェアパッケージは、ペプチドの選択のために使用され得る。これらの計算的に選択されたペプチド配列は、ＦＭＯＣペプチド合成化学または類似の方法を使用して製造され得る。当業者は、供給された配列による短いポリペプチドを合成するための、多くの化学的方法が存在することを認識する。
【０１１２】
ＯＡＳ１Ｒ遺伝子に由来するペプチドフラグメントおよび組換えタンパク質は、この遺伝子産物に対して特異的な抗体を開発するのに使用され得る。当業者が認識するように、複数の異なる宿主生物、アジュバントなどの使用を含む、抗体開発のための多くの方法が存在する。１つの古典的実施形態において、少量（１５０マイクログラム）の精製された組換えタンパク質は、ニュージーランド白ウサギの背部に皮下注射され、その後、同様の量が、数ヶ月ごとに追加免疫として注射される。その後、ウサギの血清は、静脈穿刺によって収集され、そしてこの血清、精製されたＩｇＧ、または上記免疫を与えるタンパク質に対して特異的なアフィニティー精製された抗体が、収集され得る。当業者が認識するように、同様の方法は、ラット、マウス、ヤギ、および他の生物において抗体を生じさせるのに使用され得る。上記のようなペプチドフラグメントはまた、上記ＯＡＳ１Ｒタンパク質に対して特異的な抗体を生じさせるため使用され得る。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方の発生は、本発明を実施するのに適切である。このＯＡＳ１Ｒタンパク質に対して特異的モノクローナル抗体を分泌するマウスハイブリドーマ細胞株の産生は、標準的な分子的技術によって行われ得る。
【０１１３】
上記のように調製された抗体は、細胞、組織、および器官におけるＯＡＳ１Ｒタンパク質の、存在または非存在を評価するための診断方法を開発するのに使用され得る。このアプローチの１つの実施形態において、酵素結合イムノソルベントアッセイは、精製された組換えＯＡＳ１Ｒタンパク質、およびヒト血清中のこれらのタンパク質を検出するための特異的抗体を使用して開発され得る。これらの診断方法は、上記の遺伝子変異のキャリアおよび非キャリアの組織におけるＯＡＳ１Ｒタンパク質の、存在または非存在を確認するのに使用され得る。
【０１１４】
上記のように調製された抗体はまた、これらの変異を保有する患者からネイティブなＯＡＳ１Ｒタンパク質を精製するために使用され得る。多くの方法が、ヒト細胞およびヒト組織からネイティブなタンパク質を精製する抗体を使用するのに利用可能である。１つの実施形態において、抗体は、ホモジナイズされたヒト組織およびプロテインＡを使用する抗体捕捉を包含する免疫沈降実験において使用され得る。この方法は、変異ＯＡＳ１Ｒタンパク質の、濃縮およびさらなる評価を可能にする。ＯＡＳ１Ｒのネイティブな形態を単離するための多くの他の方法が利用可能であり、その方法としては、カラムクロマトグラ

フィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、塩析、透析、電気泳動、等電点電気泳動、分画遠心法などが挙げられる。

【０１１５】

プロテオーム的方法は、２次タンパク質構造、３次タンパク質構造、および４次タンパク質構造上のＯＡＳ１Ｒ変異の効果を評価するために使用される。プロテオーム的方法はまた、このＯＡＳタンパク質の翻訳後修飾に対するＯＡＳ１Ｒ変異の影響を評価するために使用される。タンパク質に対する多くの公知の考えられる翻訳後修飾が存在し、これらとしては、プロテアーゼによる切断、グリコシル化、ホスホリル化、硫化、化学基および錯体分子の付加などが挙げられる。２次タンパク質構造および３次タンパク質構造を評価するための一般的な方法は、核磁気共鳴（ＮＭＲ）分光法である。ＮＭＲは、野生型ＯＡＳ１タンパク質とＯＡＳ１Ｒタンパク質との間の２次構造および３次構造の違いを精査するのに使用される。機能的部位の活性を評価するための方法を含む、従来のＮＭＲに対する改変もまた、適切であり、この方法としては、転移核オーバーハウザー分光法（Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｎｕｃｌｅａｒ Ｏｖｅｒｈａｕｓｅｒ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ（ＴｒＮＯＥＳＹ））などが挙げられる。当業者が認識するように、このアプローチおよび結果のデータ解析のための方法に対する多くの軽微な改変が、利用され得る。これらの方法の全ては、本発明の実施に含まれることが意図される。結晶化およびＸ線回折によってタンパク質構造を決定するための他の方法が利用される。

【０１１６】

質量分析もまた、変異ＯＡＳタンパク質と野生型ＯＡＳタンパク質との間の違いを評価するために使用され得る。この方法は、タンパク質の構造的な相違、ならびにタンパク質の翻訳後修飾における相違を評価するために使用される。このアプローチの１つの代表的な実施形態において、この野生型ＯＡＳ１タンパク質および変異ＯＡＳ１Ｒタンパク質は、上記の方法の１つを使用してヒト末梢血単核細胞から精製される。これらの細胞は、このＯＡＳタンパク質の発現を増加させるために、上記のように、インターフェロンを用いて刺激され得る。精製されたタンパク質は、特定のプロテアーゼ（例えば、トリプシン）を用いて消化され、そしてそれは、質量分析を使用して評価される。当業者が認識するように、多くの代替的な方法もまた、使用され得る。本発明は、これらのさらなる代替的な方法を企図する。例えば、マトリックス支援レーザーイオン化（ＭＡＬＤＩ）法またはエレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）質量分析法が使用され得る。さらに、質量分析は、包括的な前精製に代わるものとしての細胞タンパク質の２次元ゲル電気泳動分離の使用と組み合わせられ得る。質量分析はまた、ペプチドフィンガープリントデータベースおよび種々の検索アルゴリズムの使用と組み合わせられ得る。ホスホリル化またはグリコシル化のような翻訳後修飾における違いもまた、質量分析と種々の前処理（例えば、グリコシラーゼおよびホスファターゼを用いる）の使用とを組み合わせることによって精査され得る。これらの方法の全ては、この適用の一部として検討されるべきである。

【０１１７】

ＯＡＳ１は、テトラマーの場合に活性であり、そして自己会合に干渉する変異は、酵素活性に影響する。公知の方法が、テトラマー形成に対するＯＡＳ１Ｒ変異の効果を評価するのに使用される。例えば、ＯＡＳ１とＯＡＳ１Ｒ特異的抗体との免疫沈降は、患者の細胞、細胞培養物、またはこのＯＡＳ１もしくはＯＡＳ１Ｒを過剰発現するトランスフェクトされた細胞から得たＯＡＳ１／ＯＡＳ１Ｒ複合体を単離するために行われる。その後、これらの複合体は、当業者に周知である、ゲル電気泳動または他のクロマトグラフ的方法によって評価され得る。

【０１１８】

ＯＡＳ１は、他のタンパク質との相互作用によってウイルス抵抗性を与え得る。上記酵素は、ｂｃｌ－２ファミリーのＢＨ３ドメインに対して構造的な相同性を有する領域を含む。このドメインは、ＯＡＳ１の上記機能について重要であり得る。本発明にしたがって、ＯＡＳ１特異的抗体は、上で議論されるような種々の供給源に由来するＯＡＳ１タンパク質を含むタンパク質複合体を単離するために使用され得る。その後、これらの複合体は

、この相互作用複合体のメンバーを分離するゲル電気泳動によって評価され得る。ゲルは、多くの方法（ウェスタンブロッティングが挙げられる）を用いて精査され、そして新規な相互作用タンパク質は単離され、そしてそれは、ペプチド配列決定を使用して同定され得る。野生型抽出物およびＯＡＳ１Ｒ抽出物中のＯＡＳ複合体の含有量における違いもまた、評価される。当業者が認識するように、記載された方法は、このＯＡＳ複合体中の相互作用タンパク質を精製し、同定し、そして評価するために使用され得る多くの異なるアプローチの、ごく一部である。さらなる方法としては、ファージディスプレイおよび酵母２－ハイブリッド法の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１９】

ＯＡＳ１は、Ｃ型肝炎ウイルスのＮＳ５Ａタンパク質と相互作用することが公知である（Ｔａｇｕｃｈｉ，Ｔ．ら，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８５：９５９－９６９，２００４）。したがって、本発明は、このＮＳ５Ａタンパク質と相互作用しないＯＡＳ１タンパク質に関する（ここで、このタンパク質は、本発明のポリヌクレオチドによって発現される本発明のポリペプチドであり、これは、ＯＡＳ１のスプライシング改変体によってコードされるｍＲＮＡ、少なくとも１つの本発明の変異を含むＯＡＳ１ポリヌクレオチドによってコードされるｍＲＮＡ、コード領域中に少なくとも１つの変異を有するＯＡＳ１ポリヌクレオチドによってコードされるｍＲＮＡ、および／または少なくとも１塩基の置換、欠失または付加を有するＯＡＳ１ポリヌクレオチドによってコードされるｍＲＮＡによって発現され、ここでＮＳ５Ａタンパク質に対する結合は、変化するかまたは妨害されるが、機構に拘泥されることはない。

【０１２０】

ＮＳ５Ａタンパク質は、インターフェロンの抗ウイルス活性を阻害することによって、生物学的活性を発揮し得る。この抗ウイルス活性は、インターフェロンが２本鎖ＲＮＡのような補因子の存在下でＯＡＳ１活性を刺激する場合に正常に実行される、１つのモデルである。ＯＡＳ１は、２’－５’結合型オリゴアデニレートに対してＡＴＰを重合し、これは、１本鎖ＲＮＡ（ｍＲＮＡが挙げられる）を切断するＲＮａｓｅ　Ｌを活性化する。ＯＡＳ１に対するＮＳ５Ａの結合は、その活性を阻害し得、したがって、このウイルスＲＮＡの破壊を生じる活性のカスケードを、阻害するかまたは妨害する。

【０１２１】

本発明は、このモデルに依存しないが、ＯＡＳ１に対するＮＳ５Ａの結合は、ＯＡＳ１の変異形態がＮＳ５Ａの結合およびＮＳ５Ａの阻害を回避し、したがって、ＡＴＰを重合する通常の機能を実行し得るモデルと一致する。このような場合において、本明細書中に記載される臨床上の結果と一致して、このような変異を保有する者は、Ｃ型肝炎ウイルスによる感染に対して抵抗性である。同様に、チンパンジーが有するＯＡＳ１の短縮形態は、上記の通り、ＮＳ５Ａまたは他のウイルスタンパク質による結合を逃れ、したがって、観察される高頻度のチンパンジーのウイルスクリアランスを可能にする。いくつかの場合において、この変異は、ＮＳ５Ａに対するＯＡＳ１の結合部位に直接影響し得る。他の場合において、この変異は、実際の結合部位から離れた部位にあり得るが、ＮＳ５Ａに対するＯＡＳ１の結合が、阻害されるか、遅くされるかまたは妨害されるようなコンホメーションの変化を生じる。

【０１２２】

したがって、生理学的および病理学的に関連する様式での、このＮＳ５Ａに対するＯＡＳ１の結合は、コードされるＯＡＳ１タンパク質の生物学的機能に対する、ＯＡＳ１ポリヌクレオチド中の塩基の変異、欠失または付加の効果をアッセイするための客観的試験を提供する。このような結合は、当該分野において公知の様式でアッセイされる。Ｔａｇｕｃｈｉ，Ｔ．ら（Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８５：９５９－９６９，２００４）によって記載されるような、限定ではないが、１つの例示的な方法において、ＨｅＬａ細胞は、ＧＳＴタグ化ＮＳ５ＡおよびＨＡタグ化ＯＡＳ１をコードする発現プラスミドによって、一過性にトランスフェクトされる。この例におけるＯＡＳ１に関しては、本発明のＯＡＳ１が意味され、これとしては、ＯＡＳ１のスプライシング改変体によってコードされるＯＡ

Ｓ１、コード領域中に少なくとも１つの変異を有するＯＡＳ１ポリヌクレオチドによってコードされるＯＡＳ１、および／または少なくとも１塩基の、置換、欠失、もしくは付加を有するＯＡＳ１ポリヌクレオチドによってコードされるＯＡＳ１が挙げられる。適切なインキュベーション時間（例えば、１２時間～１６時間）の後、この細胞は、洗浄され、溶解され、そして遠心分離され、そして生じた上清は、ＧＳＴタグ化タンパク質を分離するのに役立つグルタチオン結合セファロースビーズと混合される。ＧＳＴタグ化ＮＳ５Ａタンパク質とＨＡタグ化ＯＡＳ１たんぱく質との複合体は、ＮＳ５Ａに対する抗体および抗ＨＡ抗体を使用しかつ画像化することによって同定される。この方法における改変は、個々のタンパク質に対して他のタグ（例えば、ＦＬＡＧタグ）を使用することを含む。本発明の内容において、主に変化するものは、上記ＯＡＳ１タンパク質またはＯＡＳ１ポリペプチドである。１つの生物学的に関連する活性（すなわち、宿主中で複製するウイルスの能力に関して保護性であることが公知であるＣ型肝炎タンパク質に対する結合）を実行する、このＯＡＳ１タンパク質またはＯＡＳ１ポリペプチドの活性は、これらのアッセイを使用して客観的に試験される。ＮＳ５Ａに対して結合しないＯＡＳ１タンパク質およびＯＡＳ１ポリペプチドは、治療用タンパク質として適切な候補である。

【０１２３】

このＯＡＳ１タンパク質は、ＡＴＰのオリゴアデニレート分子への変換を触媒する酵素である。数種の方法が、ＯＡＳ１酵素の活性を評価するのに利用可能である。これらの方法は、野生型酵素に対する変異タンパク質の活性に対するＯＡＳ１Ｒ変異の効果を決定するのに使用される。例えば、オリゴアデニレートシンセターゼ活性は、ポリアデニレート中への、^{32}Ｐで放射標識したＡＴＰの取り込みを定量することによって測定され得る。この放射標識されたポリアデニレートは、多くのクロマトグラフ的方法（電気泳動またはイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる）によって、長さに関して定量され、そして特徴付けられ得る。これらのアッセイはまた、基質（ＡＴＰ）の結合および酵素反応速度の特徴付けを可能にする。本明細書中に記載される活性アッセイおよび当該分野において記載されるような合成ｄｓＲＮＡを使用して、ＯＡＳ１は、ｄｓＲＮＡによって活性化される。この活性化の速度は、ＯＡＳ１において分析され、そしてＯＡＳ１Ｒと比較される。

【０１２４】

本発明のポリペプチドは、オリゴアデニレート合成活性を有する、当該分野において公知であるこれらの方法および他の方法によって、実証される。図７および図８は、本発明の数種の例示的なポリペプチドの活性を実証する。それらの活性の定量的レベルにかかわらず、この２’－５’－オリゴアデニレートを生成する能力は、ＲＮａｓｅＬの活性化を通じて抗ウイルス効果を生じることが当業者に良く理解される。このように、本発明のポリペプチドがオリゴアデニレート合成活性を有するという事実のみでも、（特に、以下に開示されるそれらの治療的使用についての検討において）有用性を有することを示す。

【０１２５】

生物学的研究は、ＯＡＳ１Ｒ変異遺伝子が、ウイルス感染から保護する程度を評価するために行われる。これらの生物学的研究は、一般的に、この変異ＯＡＳ１Ｒ遺伝子もしくはＯＡＳ１Ｒタンパク質を細胞または生物体全体に導入する形態、ならびに野生型の対照に対してそれらの生物学的活性および抗ウイルス活性を評価する形態を採る。このアプローチの１つの代表的な実施形態において、このＯＡＳ１Ｒ遺伝子は、培養中のアフリカミドリザル腎臓（Ｖｅｒｏ）細胞中に、本明細書中に記載される通りに単離されたｃＤＮＡを、ＳＶ４０プロモーター配列からクローニングされたｃＤＮＡの発現を駆動する哺乳動物発現ベクター中にクローニングすることによって導入される。このベクターはまた、このＯＡＳ１Ｒの効率的な発現、を許容する、ＳＶ４０エンハンサー要素およびサイトメガロウイルスエンハンサー要素ならびに培養における選択のためのネオマイシン耐性遺伝子を含む。その後、このＯＡＳ１Ｒ発現の生物学的効果は、デング熱ウイルスによって感染されたＶｅｒｏ細胞において評価され得る。ＯＡＳ１Ｒが複数のフラビウイルスに対する広範な抵抗性を与える場合において、このことは、ＯＡＳ１のこれらの変異形態を発現す

る細胞株における、野生型に対するウイルス増殖の減弱を予期させる。当業者が認識するように、細胞および生物中のＯＡＳ１Ｒ遺伝子およびＯＡＳ１Ｒタンパク質のこの生物学的効果、ならびに異なる感染性因子に対するそれらの生物学的効果を評価するのに使用され得る、複数の異なる実験的なアプローチが存在する。例えば、上記の例において、異なる発現ベクター、異なる細胞型、および異なるウイルス種は、このＯＡＳ１Ｒの抵抗性効果を評価するのに使用され得る。培養物中の初代ヒト細胞は、細胞株に対して評価され得る。細胞は、上記ウイルスの導入前に２本鎖ＲＮＡまたはインターフェロンによって刺激され得る。代替的なプロモーター配列および代替的なエンハンサー配列を含む発現ベクターが、評価され得る。フラビウイルス以外のウイルス（例えば、ＲＳウイルスおよびピコルナウイルス）は、評価される。

【０１２６】

トランスジェニック動物モデルは、生物の全身性ウイルス感染に対する保護におけるＯＡＳ１の変異形態の有用性を評価するために開発される。１つの実施形態において、ＯＡＳ１Ｒ遺伝子は、フラビウイルス感染に対して感受性のマウス（例えば、Ｃ３Ｈ／Ｈｅ実験室近交系）のゲノム中に導入される。これらのＯＡＳ１Ｒ遺伝子は、感受性マウスにおいて、感染を改変するか、または感染に対する抵抗性を与えるそれらの能力について評価される。当業者が理解するように、多くの標準的な方法は、マウス中にトランスジェニックヒトＯＡＳ１Ｒ遺伝子を導入するのに使用され得る。これらの方法は、組織特異的な発現パターンに影響するか、または内因性化学物質の導入、誘導プロモーターもしくは組織特異的プロモーターの使用などを介する導入遺伝子の調節を可能にする他の方法と組み合わせられ得る。

【０１２７】

Ｃ型肝炎感染についてのモデルのように、ＯＡＳ１Ｒ遺伝子を発現する細胞株は、ウシ下痢症ウイルス（ＢＶＤＶ）による感染の、感受性、抵抗性、または改変について評価され得る。ＢＶＤＶは、抗ウイルス剤の潜在的な抗ＨＣＶの効力を試験するために、一般的に使用されるモデルである（Ｂｕｃｋｗｏｌｄら，Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６０：１－１５，２００３）。１つの実施形態において、このＯＡＳ１Ｒ遺伝子は、本質的に上記のような発現ベクターを使用してＫＬ（仔ウシ肺）細胞中に導入され得、そしてこの細胞におけるＢＶＤＶ感染を改変するそれらの能力について試験され得る。さらに、ＨＣＶ感染のマウスモデル（例えば、ヒト肝臓のマウス中への移植、ヒト肝細胞のマウス肝臓中への注入など）はまた、ＯＡＳ１Ｒ遺伝子の遺伝子導入環境におけるＨＣＶ感染の改変について評価され得る。実験が行われ、それによってＯＡＳ１Ｒ遺伝子の発現の効果が、ＨＣＶウイルス培養系において評価され得る。

【０１２８】

細胞培養系はまた、種々の条件下で、アポトーシスの促進に対する変異ＯＡＳ１Ｒ遺伝子の影響について評価するために使用され得る。１つの実施形態において、ＯＡＳ１Ｒの細胞培養における変異形態は、多くのウイルス（ＢＶＤＶ、ＨＣＶ、および他のフラビウイルスが挙げられる）によって感染された細胞においてアポトーシスを促進するそれらの能力について、野生型ＯＡＳ１に対して評価され得る。当業者が認識するように、アポトーシスを測定するための多くの方法が、利用可能である。最も一般的な方法は、アガロースゲル電気泳動と組み合わせた蛍光結合法を使用する、アポトーシス細胞において特徴的なゲノム「ＤＮＡラダー」効果の検出を含む。

【０１２９】

ＯＡＳ１Ｒ変異形態の効果を増強する不完全干渉ウイルスの能力は、細胞培養モデルおよび小動物モデルにおいて試験され得る。

【０１３０】

ＯＡＳ１Ｒ遺伝子型の存在または非存在が、他のヒト表現型に影響する程度もまた、検査され得る。例えば、ＯＡＳ１Ｒ変異は、ＨＣＶ感染被検体におけるウイルス力価および自然に起きるウイルス負荷とのそれらの関連について評価される。他のフラビウイルス感染の過程と宿主ＯＡＳ１遺伝子型を関連付ける同様な方法もまた、行われ得る。ＨＣＶ感

染患者におけるインターフェロン処置またはリバビリンを伴うインターフェロン処置の際に、首尾よい結果を促すことに対するＯＡＳ１Ｒ変異の影響もまた、検査される。

【０１３１】

これらの変異は、あるレベルの感染抵抗性を与え得るだけでなく、インターフェロン－リバビリン処置を伴うかまたは伴わない感染被検体において自然に起きるウイルスクリアランスを促進し得る。さらに、精神分裂病は、フラビウイルス感染についての地方流行がある地理的区域において高頻度で起こることが報告された、これは、フラビウイルス抵抗性の対立遺伝子と精神分裂病についての素因との間の関連を示唆する。この関連は、精神分裂病の表現型およびＯＡＳ１Ｒ変異を含む、さらなる遺伝子的関連の研究を行うことによって評価される。ＩＤＤＭ、前立腺癌および他の癌、ならびに精神分裂病に対する感受性に対するＯＡＳ１Ｒ変異の影響もまた、評価される。

【０１３２】

本発明は、新規でありかつ有用性を有するＯＡＳ１Ｒ改変体ｍＲＮＡ（配列番号３６～配列番号４３として同定される）を開示する。本発明は、開示された改変体ｍＲＮＡの使用の形態に限定されない。１つの好ましい実施形態において、これらの改変体ｍＲＮＡは、ウイルス（ＨＣＶが挙げられる）の感受性を上昇させるかまたは減少させるために、ヒト被検体を示差的にスクリーニングするのに使用される。他の好ましい実施形態において、これらの改変体ｍＲＮＡは、ＩＤＤＭ、前立腺癌および他の癌、ならびに／または精神分裂病に対する感受性についてスクリーニングするのに有用である。このような示差的スクリーニングは、所定のヒト被検体に由来する試料中に存在する１つ以上の改変体ＯＡＳ１Ｒ　ｍＲＮＡの相対量を決定する、当業者に公知の発現分析によって行われる。対照試料に対するヒト被検体の試料における１つ以上のＯＡＳ１Ｒ　ｍＲＮＡ改変体の、増加量または減少量は、検討される試験に応じて、ウイルス、ＩＤＤＭ、前立腺癌および他の癌、ならびに／または精神分裂病に対するこの被検体の感受性の程度を示す。

【０１３３】

本明細書中で議論されるように、２’－５’－オリゴアデニレートシンセターゼ（ＯＡＳ）は、ＡＴＰから短い２’－５’結合型オリゴアデニレート（２－５Ａ）分子を合成する、ＩＦＮ－α－誘導性のＲＮＡ依存性エフェクター分子酵素のファミリーである。ＯＡＳ酵素は、ウイルス感染に対する非特異的免疫防御の重要部分を構成し、そしてウイルス感染についての細胞マーカーとして使用されてきた。本明細書中で議論されるＣ型肝炎感染における役割に加えて、ＯＡＳ活性は、特に、ウイルス感染が役割を果たす他の疾患状態にかかわる。

【０１３４】

特定の病原性機構は、現在の分析の対象であるが、ウイルス感染は、糖尿病のような疾患の発症において役割を果たすと考えられる。リンパ球性のＯＡＳ活性は、１型糖尿病を有する患者において顕著に上昇され、このことは、ＯＡＳが、ウイルス感染と疾患の発症との間の重要な連関であり得ることを示唆する。１組の一卵性双生児から得た糖尿病の双子に関する研究において、Ｂｏｎｎｅｖｉｅ－Ｎｉｅｌｓｅｎら（Ｃｌｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００年７月；９６（１）：１１－８）は、ＯＡＳが、発症から間がない１型糖尿病および長期にわたる１型糖尿病の両方において、持続的に活性化されることを示した。１型糖尿病において持続的に上昇したＯＡＳ活性は、正常な抗ウイルス応答とは明確に異なり、そしてこの活性は、この酵素の慢性的な刺激、下方制御機構の不全、あるいは内因性もしくは外因性のウイルスまたはそれらの産物に対する異常な応答を示し得る。

【０１３５】

ウイルス感染と糖尿病の発症との間の、より直接的な連関は、慢性Ｃ型肝炎を有する患者の、１３％と３３％との間が、対応する健康な対照または慢性Ｂ型肝炎を有する患者におけるレベルと比較して顕著に上昇したレベルの糖尿病（２型糖尿病）を有することを示す多くの研究によって例証される（Ｋｎｏｂｌｅｒら、Ａｍ　Ｊ　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．２００３年１２月；９８（１２）：２７５１－６）。これまで、ＯＡＳは、Ｃ型肝炎感染に続く糖尿病の発症において役割を果たすことが報告されていなかったが、これ

は、抗ウイルス応答システムのために有用なマーカーであり得る。さらに、本発明により報告された結果は、Ｃ型肝炎感染が糖尿病に原因として（ｃａｕｓａｌｌｙ）関連している場合に、本明細書中に開示される組成物および方法を使用するＣ型肝炎感染の阻害または排除は、糖尿病の発症の妨害または軽減において有利であり得ることを示す。

【０１３６】

さらに公開された研究は、静脈性の潰瘍および糖尿病関連性の不良な創傷治癒の事例において、ＯＡＳが、創傷治癒およびその病理学的障害について本質的な役割を果たすことを示した（ＷＯ　０２／０９０５５２）。不良な創傷治癒の事例において、影響を受けた組織中のＯＡＳ　ｍＲＮＡレベルは、１型糖尿病に苦しむ患者由来のリンパ球におけるように上昇されるよりも、むしろ減少される。これらの所見は、ＯＡＳを、糖尿病および糖尿病関連性の創傷治癒における免疫応答についての病原学的に重要なマーカーとして提示する。

【０１３７】

ＯＡＳはまた、前立腺癌に関する細胞プロセスにおいて、仲介役を果たす。ＯＡＳの主要な生物学的機能は、ＲＮａｓｅＬ（２－５Ａ分子によって酵素的に刺激される独自に調節されたエンドリボヌクレアーゼ）の活性を促進することである。ＲＮａｓｅＬは、ＩＦＮの抗ウイルス効果の媒介において良好に確立された役割を有し、そしてＲＮａｓｅＬは、遺伝性前立腺癌１対立遺伝子（ＨＰＣ１）についての有力な候補である。ＲＮａｓｅＬにおける変異は、男性における前立腺癌の高発生率の素因であることが示され、このことは、いくつかにおいて、ＲＮａｓｅＬが連関しない事例と比較してより攻撃的な疾患および／または発症年齢の低下を反映する。Ｘｉａｎｇら（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２００３年１０月１５日；６３（２０）：６７９５－８０１）は、２－５Ａの生物安定性（ｂｉｏｓｔａｂｌｅ）のホスホロチオエートアナログが、ＲＮａｓｅＬ活性を誘導し、そして後期の転移性ヒト前立腺癌細胞株の培養においてアポトーシスを引き起こしたことを実証した。それらの所見は、２－５Ａレベルにおける同時的な増加を伴うＯＡＳ活性の上昇が、強力なアポトーシスの経路を介して癌細胞の破壊を亢進し得ることを示す。したがって、本明細書中に開示される組成物および方法の使用は、前立腺癌の、検出、処置および／または妨害における有用性を見出し得る。

【０１３８】

ＯＡＳはさらに、ＲＮａｓｅＬの調節を介してか、またはいまだ未発見の経路のような別のものを介して、正常な細胞増殖調節における役割を果たす。細胞増殖のネガティブな制御におけるＯＡＳの重要性を支持する考慮すべき、重要な証拠が、存在する。Ｒｙｓｉｅｃｋｉら（Ｊ．Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　Ｒｅｓ．１９８９年１２月；９（６）：６４９－５７）は、グリア芽腫細胞株中へのヒトＯＡＳの安定なトランスフェクションが、細胞増殖の減少を生じることを実証した。ＯＡＳレベルはまた、増殖細胞株に対して静止状態の細胞株を比較するいくつかの研究において測定可能であることを示し（例えば、ＨａｓｓｅｌおよびＴｓ’Ｏ，Ｍｏｌ　Ｃａｒｃｉｎｏｇ．１９９２年；５（１）：４１－５１ならびにＫｉｍｃｈｉら，Ｅｕｒ　Ｊ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９８１年；１１４（１）：５－１０）、そしてそれぞれの事例において、このＯＡＳレベルは、静止状態の細胞において最大であった。他の研究は、Ｓ期の後期の間に急増し、その後、Ｇ２期において急激に下降するＯＡＳレベルを伴う、ＯＡＳレベルと細胞周期との間の相関関係を示した（ＷｅｌｌｓおよびＭａｌｌｕｃｃｉ，Ｅｘｐ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．１９８５年７月；１５９（１）：２７－３６）。いくつかの研究は、ＯＡＳの誘導と、種々の形態のインターフェロンによる刺激に続く抗増殖性効果の開始との間の相関関係を示した（ＰｌａｙｅｒおよびＴｏｒｒｅｎｃｅ，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｔｈｅｒ．１９９８年５月；７８（２）：５５－１１３を参照のこと）。ＯＡＳの誘導もまた、細胞分化の間に示された（例えば、Ｓａｌｚｂｅｒｇら，Ｊ　Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉ．１９９６年６月；１０９（Ｐｔ　６）：１５１７－２６ならびにＳｃｈｗａｒｔｚおよびＮｉｌｓｏｎ，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１９８９年９月；９（９）：３８９７－９０３）。血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）による（Ｚｕｌｌｏら，Ｃｅｌｌ．１９８５年１２月；４３（３　Ｐｔ　２）：７９３－８０

０）、および熱ショック誘導性増殖の条件下での（Ｃｈｏｕｓｔｅｒｍａｎら，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．１９８７年４月５日；２６２（１０）：４８０６－１１）ＯＡＳの誘導の他の報告は、ＯＡＳの誘導が、正常な細胞増殖の調節機構であるという仮説を導く。したがって、本明細書中に開示される組成物および方法の使用は、癌の検出、処置および／または予防における幅広い有用性を見出し得る。

【０１３９】

（ポリヌクレオチド分析）

オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子は、そのヌクレオチド配列が、オリゴアデニレートシンセターゼ、変異オリゴアデニレートシンセターゼ、またはオリゴアデニレートシンセターゼ偽遺伝子についてコードする核酸である。これは、ゲノムＤＮＡの形態、ｍＲＮＡの形態またはｃＤＮＡの形態であり得、そして１本鎖形態または２本鎖形態であり得る。ｍＲＮＡと比較しての、生物学的試料におけるその相対的安定性に起因して、（好ましくは、ゲノムＤＮＡが）用いられる。参照オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子の完全なゲノム配列の、連続したヌクレオチド２，１３０，０００～２，１５７，９９９からなるポリヌクレオチドの配列は、配列番号１９として配列表中に提供され、そしてそれは、Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号ＮＴ＿００９７７５．１３に対応する。

【０１４０】

この核酸試料は、細胞（代表的に、末梢血の白血球）から得られる。ｍＲＮＡが使用される場合に、上記細胞は、ＲＮａｓｅ阻害条件下において溶解される。１つの実施形態において、第１の工程は、細胞の全ｍＲＮＡを単離する工程である。その後、ポリＡ＋ｍＲＮＡが、オリゴｄＴセルロースカラムに対するハイブリダイゼーションによって選択され得る。

【０１４１】

好ましい実施形態において、この核酸試料は、オリゴアデニレートシンセターゼ対立遺伝子物質の存在について増やされる。増加は代表的に、上記ゲノムＤＮＡまたはｍＲＮＡを、本明細書中に記載されるようなポリヌクレオチド合成プライマーを利用するプライマー伸長反応に供することによって達成される。アッセイすべきサンプルを生成するための特に好ましい方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）におけるプライマーのような、前もって選択されたポリヌクレオチドを使用して増幅（ＰＣＲ）産物を形成する。

【０１４２】

（ポリヌクレオチドプライマーの調製）

プライマー、プローブおよびプライマー伸長によって合成される核酸フラグメントまたは核酸セグメントに関連して本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は、２つ以上の（好ましくは、３つより多い）デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドで構成される分子として定義される。その正確な大きさは、多くの要因に依存し、そして、最終的な使用条件に依存する。

【０１４３】

本明細書中で使用される場合、用語「プライマー」とは、核酸の制限酵素消化から精製されたか、または合成的に生成されたポリヌクレオチドを指し、これは、核酸鎖に対して相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下（すなわち、ヌクレオチドおよび重合のための因子（例えば、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素など）の存在下、ならびに適切な温度およびｐＨ）においた場合に、核酸合成の開始点として作用し得る。このプライマーは、好ましくは最大効率のために、１本鎖であるが、代替的に２本鎖形態であり得る。２本鎖の場合、このプライマーは最初に、伸長産物の調製に使用される前に、その相補鎖から分離するように処理される。好ましくは、このプライマーは、ポリデオキシリボヌクレオチドである。このプライマーは、重合化のための因子の存在下で、伸長産物の合成を開始（ｐｒｉｍｅ）するのに十分な長さである必要がある。このプライマーの正確な長さは、多くの要因（温度およびプライマーの供給源が挙げられる）に依存する。例えば、標的配列の複雑性に依存して、ポリヌクレオチドプライマーは代表的に、１５ヌクレオチド～２５ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドを含むが、より少ないヌク

レオチドを含み得る。短いプライマーは、概して十分に安定なハイブリッド複合体を鋳型とともに形成するために、より冷たい温度を必要とする。

【０１４４】

本明細書中で使用されるプライマーは、合成されるかまたは増幅されるそれぞれ特定の配列の異なる鎖に対して「実質的に」相補的であるように選択される。これは、このプライマーが、そのそれぞれの鋳型鎖に無作為的でなくハイブリダイズするのに十分に相補的である必要があることを意味する。したがって、このプライマー配列は、上記鋳型の正確な配列を反映しても反映しなくてもよい。例えば、非相補的ヌクレオチドフラグメントは、このプライマー配列の残部はこのプライマーの５’末端に対して付着され得、この鎖に対して実質的に相補的である。このような非相補的フラグメントは代表的に、エンドヌクレアーゼの制限酵素認識部位についてコードする。

【０１４５】

代替的に、非相補的塩基、またはより長い配列は、上記プライマー中に組み込まれ得る。但しこのプライマー配列は、それと共に無作為的でなくハイブリダイズするために合成されるかまたは増幅される鎖の配列と十分な相補性を有し、それにより、ポリヌクレオチド合成条件下で伸長産物を形成する。

【０１４６】

本発明のプライマーはまた、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼのプロモーター配列またはその相補体を含み得る。例えば、Ｋｒｉｅｇら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１２：７０５７－７０（１９８４）；Ｓｔｕｄｉｅｒら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１８９：１１３－１３０（１９８６）；およびＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，第２版，Ｍａｎｉａｔｉｓら編，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）を参照のこと。

【０１４７】

ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むプライマーが使用される場合、このプライマーは、増幅されるべきポリヌクレオチド鎖に対してハイブリダイズされ、そしてこのＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼプロモーターの第２のポリヌクレオチド鎖は、誘導因子（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼＩ、またはＥ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼのＫｌｅｎｏｗフラグメント）を使用して完成される。この出発ポリヌクレオチドは、ＲＮＡポリヌクレオチドの生成とＤＮＡポリヌクレオチドの生成との間の行き来によって増幅される。

【０１４８】

プライマーはまた、鋳型配列またはＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼについての複製開始部位を含む。代表的なＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼとしては、Ｌｉｚａｒｄｉら（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，６：１１９７－１２０２　１９８８）によって記載されるＱＢレプリカーゼが挙げられる。ＲＮＡ依存性ポリメラーゼは、鋳型配列または複製開始部位を含む少数の鋳型ＲＮＡ鎖から多数のＲＮＡ鎖を産生する。これらのポリメラーゼは代表的に、Ｋｒａｍｅｒら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，８９：７１９－７３６（１９７４）に記載されたように、この鋳型鎖の１００万倍の増幅を生じる。

【０１４９】

上記ポリヌクレオチドプライマーは、例えば、ホスホトリエステル法またはホスホジエステル法（Ｎａｒａｎｇら，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，６８：９０，（１９７９）；米国特許第４，３５６，２７０号、同第４，４５８，０６６号、同第４，４１６，９８８号、同第４，２９３，６５２号；およびＢｒｏｗｎら，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，６８：１０９（１９７９）を参照のこと）のような適切な方法のいずれかを使用して調製され得る。

【０１５０】

プライマーのヌクレオチド配列の選択は、検出されるべき変異についてコードする領域へのハイブリダイゼーション点からの核酸上の距離、使用される任意の第２のプライマーに対する核酸上のハイブリダイゼーション部位などのような要因に依存する。

【０１５１】
この核酸試料が、ＰＣＲ増幅によってアデニレートシンセターゼ遺伝子物質に関して増やされる場合、２つのプライマー（すなわち、ＰＣＲプライマー対）は、増幅されるべき核酸の各コード鎖のために使用されなければならない。第１のプライマーは、非コード（アンチセンスまたはマイナスまたは相補）鎖の一部となり、そしてプラス鎖またはコード鎖上のヌクレオチド配列に対してハイブリダイズする。第２のプライマーは、コード（センスまたはプラス）鎖の一部となり、そしてマイナス鎖または非コード鎖上のヌクレオチド配列とハイブリダイズする。この第１のプライマーおよび第２のプライマーの、一方または両方は、エンドヌクレアーゼ認識部位を定義するヌクレオチド配列を含み得る。この部位は、増幅されるオリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子に対して非相同的であり得る。

【０１５２】
１つの実施形態において、本発明は、プライマーの３’末端に配置されるプライミング領域を有するプライマーを形成する１組のポリヌクレオチドを利用する。このプライミング領域は代表的に、最も３’（３’末端）の１５～３０ヌクレオチド塩基である。各プライマーの３’末端のプライミング部分は、核酸合成を触媒するプライマーとして作用し得る（すなわち、その３’末端からプライマー伸長反応を開始する）。このプライマーの一方または両方は、５’末端（最も５’）の非プライミング部分（すなわち、その好ましい鋳型に対するハイブリダイゼーションに関与しない領域）を、さらに含み得る。

【０１５３】
ＰＣＲにおいて、各プライマーは、第２のプライマーとの組み合わせて働き標的核酸配列を増幅する。ＰＣＲにおける使用のためのＰＣＲプライマー対の選択は、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子領域を生成するように、本明細書中で議論されるような検討によって決定される。プライマー配列が、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子の対立遺伝子イントロン内の標的配列に対してハイブリダイズ（アニール）するように選択される場合、この標的配列は、アッセイされるべき標的配列の生成を保証するために、上記対立遺伝子間で保存されているべきである。

【０１５４】
（ポリメラーゼ連鎖反応）
オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子は、ポリヌクレオチドコード鎖（例えば、ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡのセンス鎖）で構成される。アッセイされるべき遺伝子物質が、２本鎖のゲノムＤＮＡの形態である場合、それは通常、代表的に融解によって最初に一本鎖に変性される。この核酸は、この試料をＰＣＲプライマー対（上記対の各メンバーは、前もって選択されたヌクレオチド配列を有する）とを処理する（接触させる）ことによってＰＣＲ反応に供される。このＰＣＲプライマー対は、オリゴアデニレートシンセターゼ対立遺伝子内に保存されるヌクレオチド配列（好ましくは少なくとも約１０ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも約２０ヌクレオチド長）とハイブリダイズすることによってプライマー伸長反応を開始し得る。ＰＣＲプライマー対のこの第１のプライマーは、それが、核酸の非コード鎖またはアンチセンス鎖（すなわち、コード鎖に相補的な鎖）に対してハイブリダイズすることに起因して、ときとして本明細書中で「アンチセンスプライマー」と称される。ＰＣＲプライマー対のこの第２のプライマーは、それが、核酸のコード鎖またはセンス鎖に対してハイブリダイズすることに起因して、ときとして本明細書中で「センスプライマー」と称される。

【０１５５】
上記ＰＣＲ反応は、ＰＣＲ反応混合物を形成するＰＣＲ緩衝液中で、好ましくは前もって決められた量のＰＣＲプライマー対と、好ましくは前もって決められた量のこの試料の核酸とを混合することによって行われる。この混合物は、多くのサイクルの間、温度循環され（このサイクルは代表的に、前もって決められておりＰＣＲ反応産物の形成に十分である）、それによってオリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子物質についてアッセイされるべき試料を増やす。

【０１５６】
ＰＣＲは代表的に、温度循環（すなわち、下限が、約摂氏３０度（３０℃）から約５５℃であり、上限が、約９０℃から約１００℃の温度範囲内で、ＰＣＲ反応混合物の温度を、反復的に上昇および下降させること）によって行われる。この上昇および下降は、持続的であり得るが、好ましくはポリヌクレオチド合成、変性およびハイブリダイゼーションに都合の良い温度の各々にて、比較的温度安定な時間を有する一過性なものである。
【０１５７】
複数の第１のプライマーおよび／または複数の第２のプライマーが、各増幅に使用され得る（例えば、第１のプライマーの１つの種は、多くの異なる第２のプライマーと対にされて数種の異なるプライマー対を形成し得る）。あるいは、第１のプライマーおよび第２のプライマーの個々の対が、使用され得る。いずれの場合でも、第１のプライマーおよび第２のプライマーの同じかまたは異なる組み合わせを使用する増幅の増幅産物が、変異についてアッセイするために組み合わされ得る。このＰＣＲ反応は、任意の適切な方法を使用して行われる。一般的に、それは、緩衝化水溶液、すなわち、ＰＣＲ緩衝液中で、好ましくはｐＨ７～９で、最も好ましくは約ｐＨ８で起こる。好ましくは、過剰なモル濃度（ゲノムの核酸に対して、通常、約10^6：１　プライマー：鋳型）のプライマーが、その鋳型鎖を含む緩衝液に対して混合される。大きく過剰なモル濃度は、このプロセスの有効性を改良するために好ましい。
【０１５８】
上記ＰＣＲ緩衝液はまた、デオキシリボヌクレオチド三リン酸（ポリヌクレオチド合成の基質）である、ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＴＴＰ、ならびに代表的には耐熱性のポリメラーゼを、全てプライマー伸長（ポリヌクレオチド合成）反応のために適切な量で含む。生じた溶液（ＰＣＲ混合物）は、約９０℃～１００℃で、約１～１０分間（好ましくは１～４分間）加熱される。この加熱時間後、この溶液は、プライマーのハイブリダイゼーションにとって好ましい５４℃まで冷却される。この合成反応は、室温から、それより高温ではこのポリメラーゼ（誘導因子）がもはや有効に機能しない温度までにおいて起こり得る。この温度循環は、所望の量のＰＣＲ産物が生成されるまで繰り返される。例示的なＰＣＲ緩衝液は、以下を含有する：１００マイクロリットルの緩衝液あたり５０ｍＭのＫＣｌ；１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）；１．５ｍＭのＭｇＣｌ．；０．００１％（重量／体積）のゼラチン、２００μＭのｄＡＴＰ；２００μＭのｄＴＴＰ；２００μＭのｄＣＴＰ；２００^{2}μＭのｄＧＴＰ；および２．５単位のＴｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓ（Ｔａｑ）ＤＮＡポリメラーゼＩ（米国特許第４，８８９，８１８号）。
【０１５９】
上記誘導因子は、プライマー伸長産物の合成を達成するために機能する、任意の化合物または任意のシステム（酵素を含む）であり得る。この目的のために適切な酵素としては、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼＩ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼＩのＫｌｅｎｏｗフラグメント、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ、他の利用可能なＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素および他の酵素（熱安定性の酵素を含む）などが挙げられ、これらは、適切な様式で、上記ヌクレオチドの組み合わせを促し、それぞれの核酸鎖に対して相補的である上記プライマー伸長産物を形成する。一般的に、この合成は、各プライマーの３’末端において開始され、そして合成停止まで鋳型鎖に沿って５’方向に進行し、種々の長さの分子を生成する。しかし、５’末端において合成を開始し、そして上記と同じプロセスを使用して上記の方向に進行する誘導因子が存在し得る。
【０１６０】
この誘導因子はまた、ＲＮＡプライマー伸長産物の合成を達成するために機能する化合物またはシステム（酵素を含む）であり得る。好ましい実施形態において、この誘導因子は、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３　ＲＮＡポリメラーゼまたはＳＰ６ＲＮＡポリメラーゼ）であり得る。これらのポリメラーゼは、相補的なＲＮＡポリヌクレオチドを生成する。このＲＮＡポリメラーゼの高回転率（ｈ

ｉｇｈ ｔｕｒｎ－ｏｖｅｒ ｒａｔｅ）は、Ｃｈａｍｂｅｒｌｉｎら，Ｔｈｅ Ｅｎｚｙｍｅｓ，Ｐ．Ｂｏｙｅｒ編，８７－１０８ページ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８２）に記載されたように出発ポリヌクレオチドを増幅する。転写に基づく増幅システムは、Ｇｉｎｇｅｒａｓら，ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，２４５－２５２ページ，Ｉｎｎｉｓら編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）に記載されている。

【０１６１】

上記誘導因子が、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼであり、したがってこの因子が、リボヌクレオチド三リン酸を取り込む場合、十分な量のＡＴＰ、ＣＴＰ、ＧＴＰおよびＵＴＰがプライマー伸長反応混合物に対して混合され、そして生じた溶液は、上記のように処理される。

【０１６２】

新しく合成された鎖およびその相補的な核酸鎖は、上記プロセスに続く工程に使用され得る２本鎖分子を形成する。

【０１６３】

上記ＰＣＲ反応は、オリゴアデニレートシンセターゼ遺伝子中の変異を検出するのに有用な、前もって選択された制限酵素認識部位をこの生成物中に組み込むために、有利に使用され得る。

【０１６４】

ＰＣＲ増幅法は、米国特許第４，６８３，１９２号、同第４，６８３，２０２号、同第４，８００，１５９号、および同第４，９６５，１８８号、ならびに少なくとも、ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｈ．Ｅｒｌｉｃｈ編，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）およびＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｉｎｎｉｓら編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）を含む数種の教科書に詳細に記載される。

【０１６５】

いくつかの実施形態において、第１のプライマーおよび第２のプライマーの２つの対は、増幅反応にごとに使用される。複数の異なるプライマーをそれぞれ使用して、複数の異なる増幅から得られた増幅反応産物は、別個に組み合され得るかまたはアッセイされ得る。

【０１６６】

しかし、本発明は、第１のプライマーおよび第２のプライマーの１つの対のみを使用する増幅を企図する。本明細書中に開示される変異を含むＤＮＡのセグメントを増幅するための例示的なプライマーは、以下の表１に示される。単位複製配列Ａは、配列番号１～配列番号３において参照される変異を含むポリヌクレオチド配列に対応する。単位複製配列Ｂは、配列番号４～配列番号７および配列番号６０において参照される変異を含むポリヌクレオチド配列に対応する。単位複製配列Ｃは、配列番号５７において参照される変異を含むポリヌクレオチド配列に対応する。単位複製配列Ｄは、配列番号５８において参照される変異を含むポリヌクレオチド配列に対応する。単位複製配列Ｅは、配列番号５９において参照される変異を含むポリヌクレオチド配列に対応する。単位複製配列Ｆは、配列番号６１において参照される変異を含むポリヌクレオチド配列に対応する。単位複製配列Ｇは、配列番号６２～配列番号６４において参照される変異を含むポリヌクレオチド配列に対応する。

【０１６７】

【表１】

表1

本発明の変異を含む単位複製配列

単位複製配列	プライマーA	プライマーB	産物の大きさ (bp)
単位複製配列A	5'-AATGGACCTCAAGACTTCCC-3' (配列番号8)	5'-ATTCTCCCTTCTGTTGCAGG-3' (配列番号9)	509
単位複製配列B	5'-TCCAGATGGCATGTCACAGT-3' (配列番号10)	5'-GAGCTATGCTTGGCACATAG-3' (配列番号11)	747
単位複製配列C	5'-CACAAGAGTGAACCTTAATGT-3'(配列番号65)	5'-CCAGGAAGTGGAAAGATCAT-3'(配列番号66)	603
単位複製配列D	5'-ATCTCCCACAGTTTGAGAGC-3'(配列番号67)	5'-TCAGCCTCCAAAAGTGTTGG-3'(配列番号68)	553
単位複製配列E	5'-GGGTACATGTGCACAATGTG-3'(配列番号69)	5'-CCCTTATACAAAATTCAACTC-3'(配列番号70)	532
単位複製配列F	5'-GAGCCAAGAAGTACAGATGC-3'(配列番号71)	5'-AGGACAGAGCTGTCCAATAG-3'(配列番号72)	648
単位複製配列G	5'-GGCTCAGAGAAGCTAAGTGA-3'(配列番号73)	5'-CCACAGCATCCTTTTCAGTC-3'(配列番号74)	581

表２は、上記の本発明の単位複製配列の変異の位置を開示する。

【０１６８】

【表２】

表2

単位複製配列中の本発明の変異の位置

変異	単位複製配列	単位複製配列中の位置 （単位複製配列のプライマーA側の5'末端に対する）
1 (配列番号1)	単位複製配列A	134
2 (配列番号2)	単位複製配列A	155
3 (配列番号3)	単位複製配列A	384
4 (配列番号4)	単位複製配列B	98
5 (配列番号5)	単位複製配列B	114
6 (配列番号6)	単位複製配列B	142
7 (配列番号7)	単位複製配列B	347
8 (配列番号57)	単位複製配列C	319
9 (配列番号58)	単位複製配列D	404
10 (配列番号59)	単位複製配列E	133
11 (配列番号60)	単位複製配列B	320
12 (配列番号61)	単位複製配列F	367
13 (配列番号62)	単位複製配列G	138
14 (配列番号63)	単位複製配列G	210
15 (配列番号64)	単位複製配列G	253

（核酸配列分析）

核酸配列分析は、（ａ）プローブ鎖とその相補的な標的とのハイブリダイゼーションまたは変性に基づく生理化学的技術と、（ｂ）エンドヌクレアーゼ、リガーゼおよびポリメラーゼによる酵素反応との組み合わせによって取り組まれる。核酸は、ＤＮＡレベルまたはＲＮＡレベルにてアッセイされ得る。前者は、個々のヒトの遺伝子的可能性を分析し、そして後者は、特定の細胞の発現情報を分析する。

【０１６９】

核酸のハイブリダイゼーションを使用するアッセイにおいて、本発明のプロセスにおけるＤＮＡ２重鎖の存在の検出は、種々の手段によって達成され得る。

【０１７０】

ＤＮＡ２重鎖の存在を検出するための１つのアプローチにおいて、ＤＮＡ２重鎖にハイブリダイズされるオリゴヌクレオチドは、２重鎖を検出可能にさせる標識または指示基を含む。代表的に、このような標識としては、放射活性元素、化学的に修飾されたヌクレオチド塩基などが挙げられる。

【０１７１】

上記オリゴヌクレオチドは、標識され（すなわち、指示手段または指示基に対して作動可能に連結され）、そして標的鋳型中の特定のヌクレオチド配列の存在を検出するために使用され得る。

【０１７２】

オリゴヌクレオチドプローブ（標識オリゴヌクレオチド）に対して作動可能に連結されるか、またはその一部として存在する放射活性要素は、ＤＮＡ２重鎖の検出を容易にする

有用な手段を提供する。代表的な放射活性元素は、β線放射を生じる要素である。β線を放射する元素（例えば、^{3}Ｈ、^{12}Ｃ、^{32}Ｐおよび^{35}Ｓ）は、ベータ線放射を生じる放射活性要素の標識の分類を示す。放射活性ポリヌクレオチドプローブは代表的に、ＤＮＡキナーゼを使用する放射性に標識されたヌクレオチドの核酸中への酵素的な取り込みによって調製される。放射活性的に標識されたオリゴヌクレオチドについての代替物は、金属錯化剤、ビオチン含有基、蛍光化合物などを含むように化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドである。

【０１７３】

１つの有用な金属錯化剤は、ランタニドおよび芳香族β－ジケトンによって形成されるランタニドキレートであり、このランタニドは、蛍光ランタニド錯体が形成されるように、キレート形成化合物（例えば、ＥＤＴＡアナログ）を介して核酸またはオリゴヌクレオチドに対して結合される。米国特許第４，３７４，１２０号、同第４，５６９，７９０号、ならびに公開特許出願ＥＰ０１３９６７５および公開特許出願ＷＯ８７／０２７０８を参照のこと。

【０１７４】

ビオチン標識オリゴヌクレオチドまたはアクリジンエステル標識オリゴヌクレオチド、およびそれらの標識ポリヌクレオチドの使用は、記載されている。米国特許第４，７０７，４０４号、公開特許出願ＥＰ０２１２９５１および欧州特許第００８７６３６号を参照のこと。有用な蛍光マーカー化合物としては、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ＮＢＤなどが挙げられる。

【０１７５】

ＤＮＡ２重鎖中に存在する標識されたオリゴヌクレオチドは、それ自体が標識された２重鎖を提供し、それにより、アッセイされるべき試料中に存在する他の核酸に対して区別可能である。２重鎖中の標識の存在によってこの２重鎖の存在を検出する工程は、代表的に、ＤＮＡ２重鎖に対してハイブリダイズしない標識されたオリゴヌクレオチドプローブのいずれかからこのＤＮＡ２重鎖を分離する工程を含む。

【０１７６】

ＤＮＡ２重鎖からの１本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、ハイブリダイズしていない標識されたオリゴヌクレオチドプローブ）の分離のための技術は、周知であり、そして代表的には、それらの化学的特性に基づく２本鎖核酸からの１本鎖核酸の分離を含む。さらに多くの場合に、分離技術は、ハイブリダイズしていないプローブが、代表的には洗浄することによって不溶性マトリックスに結合されたＤＮＡ２重鎖から分離される異種のハイブリダイゼーション形式の使用を含む。例示的には、このマトリックスがニトロセルロースのシートであり、そして上記標識が^{32}Ｐである、サザンブロット技術である。（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，９８：５０３（１９７５））。

【０１７７】

上記オリゴヌクレオチドはまた、代表的には５’末端かまたは５’末端近傍にて固体マトリックス（すなわち、水に不溶性の固体支持体）に有利に結合され得る。有用な固体マトリックスは、当該分野において周知であり、そしてこのマトリックスとしては、商品名ＳＥＰＨＡＤＥＸとしてＰｈａｒｍａｃｉａ Ｆｉｎｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）から入手可能な架橋デキストラン、アガロース、直径が約１ミクロン～約５ミリメートルのポリスチレンビーズまたはラテックスビーズ、塩化ポリビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース網またはナイロンビーズ網（例えば、シート、ストリップ、パドル、プレート、マイクロタイタープレートウェル）などが挙げられる。

【０１７８】

メンバーのオリゴヌクレオチドの５’末端または３’末端に対して「連結」オリゴヌクレオチドを付加し、そして上記固体支持体にこのメンバーを作動可能に結合するように、この連結オリゴヌクレオチドを使用することが可能である。

【０１７９】

ヌクレオチドがハイブリダイズするアッセイにおいて、このハイブリダイゼーション反応混合物は、企図される方法において、鋳型上の所定の配列に対して相補性を有するオリゴヌクレオチドにとって、ハイブリダイゼーション産物（すなわち、オリゴヌクレオチドおよび標的核酸を含む複合体）を形成する鋳型に存在する相補的な核酸配列に対してハイブリダイズするのに十分な時間、ハイブリダイズ条件下で維持される。

【０１８０】

語句「ハイブリダイズ条件」およびその文法的等価物は、保守時間を伴って使用される場合、このハイブリダイゼーション反応混合物を、この混合物中の反応物および付随する試薬の濃度の状況に応じて、核酸２重鎖を形成するために１つ以上のオリゴヌクレオチドを標的配列とアニールさせるのに十分である時間条件、温度条件およびｐＨ条件に供することを示す。当該分野において周知であるように、ハイブリダイゼーションを達成するために必要とされるこのような時間条件、温度条件およびｐＨ条件は、ハイブリダイズされるオリゴヌクレオチドの長さ、このオリゴヌクレオチドとその標的との間の相補性の程度、このオリゴヌクレオチドのグアニン含有量およびシトシン含有量、望まれるハイブリダイゼーションの厳密さ、およびハイブリダイゼーションの速度に影響し得るような、ハイブリダイゼーション反応混合物中の塩またはさらなる試薬の存在に依存する。所与のハイブリダイゼーション反応混合物のためにハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は、当該分野において周知である。代表的なハイブリダイズ条件は、ｐＨ４とｐＨ９との間での緩衝化された溶液の使用を含み、そして４℃～３７℃の温度にて行われ、好ましくは約１２℃～約３０℃にて行われ、さらに好ましくは２２℃にて行われ、そして０．５秒間～２４時間行われ、好ましくは２分間～１時間行われる。

【０１８１】

ハイブリダイゼーションは、周知であるような、同種（ｈｏｍｏｇｅｎｅｏｕｓ）の形式または異種（ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｏｕｓ）の形式において行われ得る。均一なハイブリダイゼーション反応は、全て溶液中で起こり、オリゴヌクレオチドおよびハイブリダイズされる核酸配列（標的）の両方が溶液中に可溶性の形態で存在する。不均一な反応は、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドプローブまたは標的核酸のいずれかが結合される、反応媒体において、不溶性であるマトリックスの使用を含む。

【０１８２】

標的配列を含む核酸は、２本鎖（ｄｓ）形態である場合、ハイブリダイゼーション反応を行う前に、加熱またはアルカリ処理によって、初めにｄｓＤＮＡを変性することが好ましい。このｄｓＤＮＡの変性は、ハイブリダイズされるオリゴヌクレオチドとの混合前に行われ得るかまたはオリゴヌクレオチドとｄｓＤＮＡとの混合後に行われ得る。

【０１８３】

上記オリゴヌクレオチドと上記鋳型との間の所定の相補性は、２つの代替的様式において達成される。この鋳型ＤＮＡ中の配列は、公知である（例えば、形成されるプライマーが、公知のオリゴアデニレートシンセターゼ配列に対してハイブリダイズし得、そして配列決定目的、ならびにその後の、本明細書中に記載されるようなアッセイ目的のためにＤＮＡの領域中にプライマー伸長を開始し得る場合、またはこれまでの配列決定が、ヌクレオチド配列の領域を決定し、そしてこのプライマーが、先だって配列決定された領域から未知の配列の領域中に伸長するように設計される場合）。この後者のプロセスは、配列決定の各回が、これまでに決定された配列に基づいて設計されたプライマーによって方向付けられることに起因して、「有向配列決定（ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）」と称される。

【０１８４】

ハイブリダイゼーション反応混合物中に存在するオリゴヌクレオチドの有効量は一般的に周知であり、そしてこれは代表的に、ハイブリダイズされるオリゴヌクレオチドとこの鋳型との間のモル比に関して表される。好ましいモル比は、この標的配列およびこのオリゴヌクレオチドの当モル量を含むハイブリダイゼーション反応混合物である。周知であるように、等しいモル濃度からの逸脱は、ハイブリダイゼーション反応混合物を形成するが

、その効率は、より低い。したがって、１つの成分が、その他の成分に対して１００倍程度モル過剰であり得るモル比は望ましいが、５０倍未満過剰であるモル比、好ましくは１０倍未満過剰であるモル比、そしてより好ましくは２倍未満過剰であるモル比が、本発明の実施において望ましい。

【０１８５】

（膜に固定された標的配列の検出）

ＤＮＡ（サザン）ブロット技術において、これまでに議論されたように、ＤＮＡは、ＰＣＲ増幅によって調製される。このＰＣＲ産物（ＤＮＡフラグメント）は、アガロースゲル中で、大きさに従って分離され、そしてニトロセルロース膜またはナイロン膜上に移される（ブロットされる）。従来の電気泳動は、１００塩基対～３０，０００塩基対の範囲のフラグメントを分離するが、パルスフィールドゲル電気泳動は、２０００万塩基対の長さまでのフラグメントを分離する。含まれる特定のＰＣＲ産物の膜上での配置は、特定の標識された核酸プローブを用いるハイブリダイゼーションによって決定される。

【０１８６】

好ましい実施形態において、ＰＣＲ産物は、ドットブロット（スロットブロット）器具を使用して固体マトリックス（ニトロセルロース膜）上に直接固定され、そしてプローブハイブリダイゼーションによって分析される。米国特許第４，５８２，７８９号および同第４，６１７，２６１号を参照のこと。

【０１８７】

固定されたＤＮＡ配列は、対立遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）プローブを用いる精査によって分析され得、このプローブは、約１５ヌクレオチド長、１７ヌクレオチド長、２０ヌクレオチド長、２５ヌクレオチド長または約３０ヌクレオチド長までの合成ＤＮＡｎオリゴマーである。これらのプローブは、ゲノム中の固有の配列を示すのに十分な長さであるが、それらの標的分子に対するハイブリダイゼーションにおける内部のミスマッチによって不安定化するために十分短い。したがって、１つのヌクレオチドにおいて異なる任意の配列は、慎重に制御されたハイブリダイゼーション条件下での、ＡＳＯプローブと正常な標的または変異標的との間のハイブリッドの変性挙動の違いによって区別され得る。例示的なプローブは、配列番号１～配列番号７および配列番号５７～配列番号６４として本明細書中に開示される（表３）が、任意のプローブは、それらが、目的の点変異を保有する上記ＯＡＳ１遺伝子の領域に対して特異的にハイブリダイズし、そして点変異ポリヌクレオチドを保有するポリヌクレオチドと野生型ポリヌクレオチドを保有するポリヌクレオチドとの間の特異的な区別が可能である限りは適切である。

【０１８８】

（溶液中の標的配列の検出）

核酸の精製または核酸の固定を必要としない数種の迅速な技術が、開発されてきた。例えば、プローブ／標的ハイブリッドは、２本鎖核酸を優先的に結合するヒドロキシアパタイトのような固体マトリックス上で選択的に単離され得る。あるいは、プローブ核酸は、固体支持体に固定され、そして溶液から標的配列を捕捉するために使用され得る。標的配列の検出は、競合型アッセイにおいて標的配列によって上記支持体から動かされるか、またはサンドウィッチ型形式においてこの標的配列の架橋作用を介してその支持体に結合されるかのいずれかである第２の標識されたプローブの補助によって達成され得る。

【０１８９】

オリゴヌクレオチド連結アッセイ（ＯＬＡ）において、酵素ＤＮＡリガーゼは、合成オリゴヌクレオチドが、正確な頭－尾の近位において標的配列と塩基対形成し得るように２つの合成オリゴヌクレオチドを共有結合するために使用される。２つのオリゴマーの連結は、結合領域におけるミスマッチヌクレオチドの存在によって妨害される。この手順は、ＤＮＡ精製を必要とせずに、細胞の試料における公知の配列改変体の間の区別を可能にする。２つのオリゴヌクレオチドの結合は、この２つのオリゴヌクレオチドの１つを固定し、そして上記第２の標識されたオリゴヌクレオチドもまた捕捉されるか否かを観察することによってモニタリングされ得る。

【０１９０】
（塩基置換の検出のための走査技術）
３つの技術は、未知の１ヌクレオチド置換または他の配列の相違に関する数百塩基対の長さのプローブ／標的２重鎖の分析を可能にする。リボヌクレアーゼ（ＲＮａｓｅ）Ａ技術において、この酵素は、標識されたＲＮＡプローブが、標的ＲＮＡ配列または標的ＤＮＡ配列に対してミスマッチである位置にて、このプローブを切断する。このフラグメントは、変異のおおよその位置の決定を可能にする大きさにしたがって分離され得る。米国特許第４，９４６，７７３号を参照のこと。
【０１９１】
変性勾配ゲル技術において、プローブ－標識ＤＮＡの２重鎖は、強度が増加する変性勾配における電気泳動によって分析される。変性は、移動率における減少によって達成される。ミスマッチ塩基対を有する２重鎖は、完全にミスマッチである２重鎖より、より迅速に変性する。
【０１９２】
第３の方法は、ミスマッチ塩基対の化学的切断に依存する。Ｔと、Ｃ、ＧまたはＴとの間のミスマッチ、ならびにＣと、Ｔ、ＡまたはＣとの間のミスマッチは、ヘテロ２重鎖において検出され得る。四酸化オスミウムとの反応（ＴミスマッチおよびＣミスマッチ）またはヒドロキシルアミンとの反応（Ｃミスマッチ）と、その後のピペリジンによる処理は、適切なミスマッチにおいて上記プローブを切断する。
【０１９３】
（ＯＡＳ１機能を復元および／または向上するための治療因子）
ＯＡＳ１遺伝子中の変異が、不完全なＯＡＳ１機能を生じ、そしてこの不完全な機能が、病原体の感染に対する患者の上昇した感受性に関連する場合、ＯＡＳ１タンパク質の低レベル、その機能に影響を与えるタンパク質中の変異、または他の機構を介するか否かにかかわらず、それは、野生型ＯＡＳ１タンパク質を有する患者を処置するのに有利である。
【０１９４】
さらに、この変異が、感染抵抗性のキャリアにおいて生じて、この野生型タンパク質と異なり、そしてＨＣＶ感染の阻害に関して利点を有するタンパク質の形態を与える場合、変異遺伝子によってコードされるタンパク質を投与することは、有利であり得る。これまでに記載されるように、ＯＡＳ１タンパク質もしくはＯＡＳ１ポリペプチドの、ネイティブな形態または変異形態はまた、他の兆候（癌、糖尿病、および創傷治癒が挙げられるが、これらに限定されない）の処置において有利であり得る。以下の議論は、前述のタンパク質またはポリペプチドの任意の投与に関連する。
【０１９５】
ＯＡＳ１Ｒによってコードされるポリペプチドを含む本発明のポリペプチドは、天然から精製された生成物、または化学合成手順の生成物であっても、本発明のポリヌクレオチド配列の、原核生物宿主または真核生物宿主（例えば、培養における、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞によって）からの組換え技術によって産生されてもよい。組換え産生手順において利用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、哺乳動物の炭水化物または他の真核生物の炭水化物によってグリコリル化されてもグリコリル化されなくてもよい。本発明のポリペプチドはまた、先頭にメチオニンのアミノ酸残基を含む（位置マイナス１にて）。
【０１９６】
本発明のポリペプチドはまた、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号４６、および配列番号４７において定義されるタンパク質配列ならびにそれらの誘導体を含む。
【０１９７】
上記ポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子の形態に加えて、本発明はまた、天然に

存在する対立遺伝子の形態と同様に機能する、それらのアナログおよびフラグメントを包含する。したがって、例えば、このポリペプチドの１つ以上のアミノ酸残基は、上記ＯＡＳ１Ｒタンパク質の機能が維持される限り、保存的アミノ酸残基によって置換され得る。以下の実施例８～実施例１０は、本発明のポリペプチドに関する適切なアミノ酸置換の代表的な例示を提供する。別の例として、本発明のポリペプチドは具体的に、配列番号４８、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１および配列番号５２に定義されるＯＡＳ１Ｒの短縮形態またはアナログ形態を含む。これまでに議論されたように、配列番号５１は、チンパンジーが有するＯＡＳ１の短い形態を示し、そして配列番号５２は、ゴリラが有する、より長いが、なお短縮された形態のカルボキシル末端フラグメントを示す。配列番号４９および配列番号５０は、それぞれ、対応するチンパンジーの切断部位およびゴリラの短縮部位について短縮された、合成のヒトＯＡＳ１Ｒ構築物を示す。配列番号４８は、上記チンパンジーの形態およびゴリラの形態に対して中間の長さに切断された合成のヒトＯＡＳ１Ｒポリペプチドを示す。配列番号４８は、本明細書中の他で開示されるように、当該分野において公知の方法によって酵素的に活性であることがさらに実証された。対応して、残りの非常に類似する短縮形態もまた、酵素的に活性であることが実証された。当業者が理解するように、ＯＡＳ１Ｒの、短縮されたが機能的である形態の治療的使用は、そうしなければこのポリペプチドの治療的効力を妨げ得る抗体反応の発生を防止し得る。前述の短縮ポリペプチドおよび当業者によって想定され得る他のポリペプチドは、機能を維持するが、全長ＯＡＳ１Ｒポリペプチドを内因的に有しない個体における抗体反応を誘導し得る上記ポリペプチドの非偏在性の部分を除去する。当業者はまた、より小さいポリペプチドが、代表的には治療薬の開発において直面する、製造、送達およびクリアランスの複雑性の影響を、一般的に、より改善しやすいことを理解する。さらに、当業者は、チンパンジーおよびゴリラにおける別の相同的な短縮改変体の出現もまた、本開示の短縮型ＯＡＳ１形態の広い抗ウイルス効力について、強く示唆していることを理解する。具体的に上で開示されたこの短縮ポリペプチド形態は、このポリペプチドのカルボキシル末端に対する短縮を示すが、本発明は、このフラグメントの形態に限られず、そして特に酵素的機能を維持する、アミノ末端の短縮および内部のアミノ酸欠失を含む。

【０１９８】

具体的に開示されたポリペプチドの少なくとも１つの活性を維持するが、開示されたアミノ酸配列と異なるポリペプチドもまた、本発明の範囲に含まれる。好ましくは、このようなポリペプチドは、アライメントの標準的な方法を使用して計算される場合に、対応する開示された配列番号に対して、少なくとも８０％の配列相同性を有し、好ましくは８５％の配列相同性を有し、より好ましくは９０％の配列相同性を有し、最も好ましくは９５％より高い配列相同性を有する。

【０１９９】

上記ポリペプチドはまた、インビボでのこのようなポリペプチドの発現によって、本発明にしたがって利用され、これは、多くの場合、遺伝子治療といわれる。したがって、例えば、細胞は、エキソビボで上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（ＤＮＡまたはＲＮＡ）によって形質転換され、この形質転換細胞は、その後、上記ポリペプチドを用いて治療される患者に対して提供され得る。このような方法は、当該分野において周知である。例えば、細胞は、本発明のポリペプチドをコードするＲＮＡを含むレトロウイルス粒子の使用による当該分野において公知の手順によって形質転換され得る。

【０２００】

同様に、細胞の形質転換は、例えば、当該分野において公知の手順によってインビボでの上記ポリペプチドの発現についてインビボで達成され得る。当該分野において公知であるように、本発明のポリペプチドをコードするＲＮＡを含むレトロウイルス粒子を産生するための生産細胞は、インビボでの形質転換およびインビボでのポリペプチドの発現のために患者に投与され得る。

【０２０１】

このような方法によって本発明のポリペプチドを投与するためのこれらの方法および他

の方法は、本発明の教示により当業者に明らかにされるべきである。例えば、細胞を形質転換するための発現ビヒクルは、レトロウイルス以外（例えば、適切な送達ビヒクルとの組み合わせ後に、インビボで細胞を形質転換するために使用され得るアデノウイルス）であり得る。

【０２０２】

上記ポリペプチドが液体処方物として調製され、そして注射によって投与される場合において、好ましくは、この溶液は、ｐＨ７．４で、１４０ミリモルの塩化ナトリウムおよび１０ミリモルのカルシウムを含む等浸透圧の塩溶液である。この注射は、例えば、治療有効量で投与され得、投与経路、患者の健康などに応じて、好ましくは約１μｇ／ｋｇ体重／日～約５ｍｇ／ｋｇ体重／日の用量で投与され得る。

【０２０３】

本発明のポリペプチドは、適切な薬学的キャリアとの組み合わせで利用され得る。このような組成物は、このタンパク質の治療有効量、および薬学的に受容可能なキャリアまたは薬学的に受容可能な賦形剤を含む。このようなキャリアとしては、生理食塩水、緩衝化された生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。この処方物は、投与の形態に適するべきである。

【０２０４】

本発明のポリペプチドはまた、このポリペプチドを、このポリペプチドの活性、細胞の分布もしくは細胞の取り込みを向上させる、１つ以上の部分または抱合体にこのポリペプチドを化学的に連結することによって修飾され得る。このような部分または抱合体としては、例えば、米国特許第５，５１４，７５８号、同第５，５６５，５５２号、同第５，５６７，８１０号、同第５，５７４，１４２号、同第５，５８５，４８１号、同第５，５８７，３７１号、同第５，５９７，６９６号、および同第５，９５８，７７３に開示される通り、コレステロール、コール酸、チオエーテル、脂肪族鎖、リン脂質およびそれらの誘導体のような脂質、ポリアミン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、パルミトイル部分などが挙げられる。

【０２０５】

本発明のポリペプチドはまた、特定の疾患の兆候について特異的な細胞型を標的化するために修飾され得、この細胞型としては、Ｃ型肝炎感染の場合における肝細胞が挙げられるが、これに限定されない。当業者によって理解され得るように、適切な方法は、上記の標的目標を達成し、そしてこの方法としては、リポソームによる標的、レセプター媒介性エンドサイトーシス、および抗体－抗原結合が挙げられるが、これらに限定されないことが記載されてきた。１つの実施形態において、このアシアロ糖タンパク質（ａｓｉａｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ）レセプターは、上記ポリペプチドに対するガラクトース部分の付加によって肝細胞を標的化するために使用され得る。別の実施形態において、マンノース部分は、マクロファージおよび肝細胞において見出されるマンノースレセプターを標的化するために、このポリペプチドに対して結合され得る。本発明のポリペプチドはまた、当業者に公知の方法によるサイトゾル送達のために修飾され得、この方法としては、エンドソーム回避機構またはタンパク質変換ドメイン（ＰＴＤ）システムが挙げられるが、これらに限定されない。ＰＴＤシステムは、例えば、Ｖｉｖｅｓ Ｅら、（１９９７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：１６０１０－１６０１７，Ｄｅｒｏｓｓｉら、（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：１０４４４－１０４５０，Ｅｌｌｉｏｔｔ，Ｇら、（１９９７）Ｃｅｌｌ ８８：２２３－２３３，Ｗａｄｉａ，ＪＳら、（２００４）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１０：３１０－３１５，およびＫａｂｏｕｒｉｄｉｓ，ＰＳ．（２００３）Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２１：４９８－５０３に開示される。公知のエンドソーム回避システムとしては、ポリ（プロピルアクリル酸）のようなｐｈ応答性ポリマーのキャリアの使用が挙げられる。公知のＰＴＤシステムは、ＨＩＶ－１ ＴＡＴ、ＨＳＶ－１ ＶＰ２２、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ａｎｔｅｎｎａｐｅｄｉａ、またはジフテリア毒のような天然のペプチドから合成のペプチドキャリアにおよぶ（ＷａｄｉａおよびＤｏｗｄ

ｙ，Ｃｕｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１３：５２－５６，２００２年；Ｂｅｃｋｅｒ－Ｈａｐａｋら，Ｍｅｔｈｏｄｓ　２４：２４７－２５６，２００１）。図１０は、数種のこれらの例示的ＰＴＤの詳細な説明を提供する。当業者が認識するように、複数の送達方法および複数の標的方法は、組み合わせられ得る。例えば、本発明のポリペプチドは、アシアロ糖タンパク質レセプターに対して標的するためにガラクトースに結合されるようなリポソーム内への封入によって肝細胞に対して標的され得る。

【０２０６】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の１つ以上の成分で満たされた１つ以上の容器を備える、薬学的パックまたは薬学的キットを提供する。ヒト投与に関する製造、使用または販売についての行政機関による承認を反映する、医薬品もしくは生物学的製剤の、製造、使用または販売を規制する行政機関によって定められた形式の通知は、このような容器に付属し得る。さらに、本発明のポリペプチドは、他の治療用化合物との組み合わせで使用され得る。

【０２０７】

本発明のＯＡＳ１改変体が、医薬品として使用される場合、これらは、適切なビヒクル中で哺乳動物に対して投与され得る。本発明のポリペプチドが、上記のように、医薬品として使用される場合、これらは、例えば、投与経路、患者の健康などに応じて、約１０μｇ／ｋｇ体重／日～約４ｍｇ／ｋｇ体重／日の治療有効用量で投与される。この与えられる量は、好ましくはウイルス（好ましくはフラビウイルス、最も好ましくはＨＣＶ）による感染の防御または阻害を達成し、したがって、本明細書中に開示されるようなＯＡＳ１Ｒ対立遺伝子を保有するヒトにおいて見出される天然の抵抗性を再現するのに適する。

【０２０８】

ＮＴ＿００９７７５．１３の、位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８における少なくとも１つの変異の有益な効果を模倣する、インヒビターに基づく薬物治療はまた、以下に詳細に議論されるように想定される。これまでに議論されたように、このようなインヒビターを開発するための１つの例示的な理論的根拠は、有益な変異が、ＯＡＳ１の１つ以上の特定のアイソフォームの発現、翻訳、もしくは機能を消失させるかまたは排除する事例である。本発明は、この有益な変異の効果もしく正確な形態にも、それによって影響されるこの特定のアイソフォームの生物学的活性によっても制限されない。このような場合において当業者は、ＯＡＳ１の上記特定のアイソフォームを治療的に阻害することの有用性を理解する。これらのインヒビターに基づく治療は、化学的実体、ペプチドまたはタンパク質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小さい干渉ＲＮＡ、および抗体の形態を採り得る。

【０２０９】

上記タンパク質、それらのフラグメントもしくは他の誘導体、またはそれらのアナログ、あるいはこれらを発現する細胞は、それに対する抗体を産生する免疫原として使用され得る。これらの抗体は、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、１本鎖、Ｆａｂフラグメント、またはＦａｂ発現ライブラリーの生成物であり得る。当該分野において公知である種々の手順は、ポリクローナル抗体の産生のために使用され得る。

【０２１０】

本発明のＯＡＳ１Ｒによってコードされるポリペプチドに対して産生される抗体は、このポリペプチドの動物中への直接の注射によってか、または動物（好ましくは非ヒト）このポリペプチドを投与することによって得られ得る。その後、そうして得られた抗体は、このポリペプチド自体に結合する。この様式において、このポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえ、ネイティブなポリペプチド全体に結合する抗体を産生するのに使用され得る。さらに、多数のポリペプチドに対して特異的な、このような抗体の一団は、このような組織を同定しかつ区別するために使用され得る。例として、図９は、本発明の特定の例示的なポリペプチドに対して特異的な抗体の発生を実証する。

【０２１１】
モノクローナル抗体の調製に関して、継続的な細胞株培養によって産生される抗体を提供する任意の技術が、使用され得る。例としては、ハイブリドーマ技術（ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ，１９７５年，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５－５９７）、トリオーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒら，１９８３年，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｔｏｄａｙ　４：７２）、ならびにヒトモノクローナル抗体を産生するＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｅら，１９８５年，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．７７－９６ページ）が挙げられる。

【０２１２】
１本鎖抗体の産生について記載された技術（米国特許第４，９４６，７７８号）は、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対する１本鎖抗体を産生するのに適合され得る。

【０２１３】
上記抗体は、本発明のタンパク質配列の局在および活性に関する方法（例えば、これらのタンパク質を画像化すること、適切な生理学的試料におけるそれらのレベルを測定することなど）に使用され得る。

【０２１４】
本発明は、細胞内のＯＡＳ１ポリヌクレオチドを画像化するための、直接的に標識されたオリゴヌクレオチドを提供する。このようなオリゴヌクレオチドは、遺伝子増幅が生じたか否かを決定するため、および、例えば、当該分野において公知であるようなインサイチュハイブリダイゼーションを使用して細胞および組織における発現レベルをアッセイするために有用である。

【０２１５】
（ＯＡＳ１機能の阻害のための治療因子）
本発明はまた、ＯＡＳ１ポリヌクレオチドの正常な機能と干渉するように設計されたアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。アンチセンス技術に広く適用できる当該分野において公知であるアンチセンス分子の、任意の修飾または改変は、本発明の範囲内に含まれる。このような修飾としては、米国特許第５，５３６，８２１号、同第５，５４１，３０６号、同第５，５５０，１１１号、同第５，５６３，２５３号、同第５，５７１，７９９号、同第５，５８７，３６１号、同第５，６２５，０５０号および同第５，９５８，７７３号に開示されるようなリン含有結合の調製が挙げられる。

【０２１６】
本発明のアンチセンス化合物としては、米国特許第５，９５８，７７３号およびその中に開示される特許に開示されるような修飾された塩基が挙げられ得る。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、このアンチセンスオリゴヌクレオチドについての活性、細胞の分布もしくは細胞の取り込みを向上させる、１つ以上の部分または抱合体にこのオリゴヌクレオチドを化学的に連結することによって修飾され得る。このような部分または抱合体としては、例えば、米国特許第５，５１４，７５８号、同第５，５６５，５５２号、同第５，５６７，８１０号、同第５，５７４，１４２号、同第５，５８５，４８１号、同第５，５８７，３７１号、同第５，５９７，６９６号、および同第５，９５８，７７３に開示される通り、コレステロール、コール酸、チオエーテル、脂肪族鎖、リン脂質、ポリアミン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、パルミトイル部分などのような脂質が挙げられる。

【０２１７】
キメラアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた、本発明の範囲内であり、そして、例えば、米国特許第５，０１３，８３０号、同第５，１４９，７９７号、同第５，４０３，７１１号、同第５，４９１，１３３号、同第５，５６５，３５０号、同第５，６５２，３５５号、同第５，７００，９２２号、および同第５，９５８，７７３号に記載される方法を使用して本発明のオリゴヌクレオチドから調製され得る。

【０２１８】

好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、実施例に記載されるアッセイを使用する慣習的な実験によって選択され得る。本発明は、作用の特定の機構に拘束されないが、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Ｗａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋの塩基対形成を使用する細胞内の標的ポリヌクレオチドの相補的領域に対して結合することによって阻害効果を達成すると考えられる。この標的ポリヌクレオチドがＲＮＡである場合、実験的証拠は、このハイブリッドのＲＮＡ成分がＲＮａｓｅ　Ｈによって切断されることを示す（Ｇｉｌｅｓら，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２３：９５４－６１，１９９５年；米国特許第６，００１，６５３号）。一般的に、１０塩基対を含むハイブリッドは、ＲＮａｓｅ　Ｈに対する基質として働くのに十分な長さである。しかし、結合の特異性を達成するために、この長さの配列が、ヒト遺伝子間で独特である確率が高い場合、少なくとも１７ヌクレオチドのアンチセンス分子を使用することが好ましい。

【０２１９】

本明細書中に参考として援用される米国特許第５，９９８，３８３号に開示されるように、上記オリゴヌクレオチドは、この配列が、それらの相補的な鋳型とのオリゴヌクレオチド２重鎖の形成に重要な、適切なエネルギー関連の特徴を示し、そして自己二量体化または自己相補性についての低い可能性を示すように選択される（Ａｎａｚｏｄｏら，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２２９：３０５－０９，１９９６年）。コンピュータープログラムＯＬＩＧＯ（Ｐｒｉｍｅｒ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ　３．４）は、アンチセンス配列の融解温度、自由エネルギー特性を決定するため、および自己二量体形成および自己相補性特性の可能性を見積もるために使用される。このプログラムは、これらの２つのパラメーター（自己二量体化または自己相補性の可能性）の定性的な見積りの決定を可能にし、そして「可能性なし」または「いくぶんの可能性」または「本質的に完全な可能性」の表示を提供する。ＯＡＳ１ポリヌクレオチドのセグメントは一般的に、これらのパラメーター中に可能性なしの見積りを有するように選択される。しかし、この分類の１つにおける「いくぶんの可能性」を有するセグメントは、使用され得る。パラメーターのバランスは、この選択に使用される。

【０２２０】

アンチセンス技術において、ある程度の慣習的な実験は、特定の標的のための最適なアンチセンス分子を選択するために必要とされる。有効であるために、このアンチセンス分子は、好ましくは標的ＲＮＡ分子の接近可能であるかまたは露出される部分に標的する。いくつかの場合において、標的ｍＲＮＡ分子の構造についての情報は、入手可能であるが、アンチセンスを使用する阻害に対する現存のアプローチは、実験を介する。本発明にしたがって、この実験は、実施例に記載される方法を使用するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて細胞をトランスフェクトすることによって慣習的に行われ得る。この細胞中のｍＲＮＡレベルは、このｍＲＮＡの逆転写およびｃＤＮＡレベルをアッセイすることによって、処理される細胞および対照細胞において慣習的に測定され得る。この生物学的効果は、当該分野において公知であるように、細胞増殖または細胞生存度を測定することによって慣習的に決定され得る。

【０２２１】

ｃＤＮＡレベルをアッセイしそして分析することによるアンチセンス活性の特異性を測定することは、アンチセンスの結果を確認する当該分野において認識された方法である。処理された細胞および対照細胞から得たＲＮＡは、逆転写されるべきであること、その結果として生じたｃＤＮＡ集団が分析されるべきであることが示された。（Ｂｒａｎｃｈ，Ａ．Ｄ．，Ｔ．Ｉ．Ｂ．Ｓ．２３：４５－５０，１９９８年）。本発明にしたがって、細胞の培養物は、ＯＡＳ１を標的化するために設計された２つの異なるアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてトランスフェクトされる。ＯＡＳ１に対応するこのｍＲＮＡのレベルは、処理された細胞および対照細胞において測定される。

【０２２２】

さらなるインヒビターとしては、リボザイム、タンパク質またはポリペプチド、抗体またはそのフラグメント、ならびに小分子が挙げられる。これらのＯＡＳ１インヒビターの

各々は、それらが、ＯＡＳ１の発現および／またはＯＡＳ１の生物学的活性を減少させるという一般的な特徴を共有する。本明細書中に開示される例示的なＯＡＳ１インヒビターに加えて、代替的なインヒビターは、本明細書中に具体的に開示されるか、またはそうでなければ当業者にとって容易に入手可能でありかつ当業者の専門知識内であるような方法論を利用する慣習的な実験を通じて得られ得る。

【０２２３】

（リボザイム）

ＯＡＳ１インヒビターは、リボザイムであり得る。リボザイムは、ＲＮＡ基質（例えば、ｍＲＮＡ）を特異的に切断し、細胞の遺伝子発現の特異的な阻害、または干渉を生じる。本明細書中で使用される場合、用語リボザイムとしては、特異的認識のためのアンチセンス配列、およびＲＮＡを切断する酵素活性を含むＲＮＡ分子が挙げられる。この触媒的な鎖は、化学量論の濃度より大きい濃度にて、標的ＲＮＡ中の特定の部位を切断する。

【０２２４】

多種多様なリボザイムが、本発明の状況において使用され得、このリボザイムとしては、例えば、ハンマーヘッド型リボザイム（例えば、ＦｏｒｓｔｅｒおよびＳｙｍｏｎｓ，Ｃｅｌｌ　４８：２１１－２０，１９８７年；ＨａｓｅｌｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ，Ｎａｔｕｒｅ　３２８：５９６－６００，１９８８年；ＷａｌｂｏｔおよびＢｒｕｅｎｉｎｇ，Ｎａｔｕｒｅ　３３４：１９６，１９８８年；ＨａｓｅｌｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ，Ｎａｔｕｒｅ　３３４：５８５，１９８８年に記載されるもの）、ヘアピン型リボザイム（例えば１９９３年１０月１９日に公表された、Ｈａｓｅｌｏｆｆらの米国特許第５，２５４，６７８号、および１９９０年３月２６日に公開された、Ｈｅｍｐｅｌらの欧州特許公開番号０　３６０　２５７に記載されるもの）、およびテトラヒメナのリボソームＲＮＡに基づくリボザイム（Ｃｅｃｈらの米国特許第４，９８７，０７１号を参照のこと）が挙げられる。本発明のリボザイムは代表的に、ＲＮＡからなるが、これはまた、ＤＮＡ、核酸アナログ（例えば、ホスホロチオエート）、またはそれらのキメラ（例えば、ＤＮＡ／ＲＮＡ／ＲＮＡ）で構成され得る。

【０２２５】

リボザイムは、任意のＲＮＡ転写物に対して標的化され得、そしてこのような転写物を酵素的に切断し得る（例えば、米国特許第５，２７２，２６２号、同第５，１４４，０１９号、ならびにＣｅｃｈらの米国特許第５，１６８，０５３号、同第５，１８０，８１８号、同第５，１１６，７４２号、および同第５，０９３，２４６号を参照のこと）。本発明の特定の実施形態にしたがって、このようなＯＡＳ１　ｍＲＮＡ特異的リボザイムのいずれか、またはこのようなリボザイムをコードする核酸は、ＯＡＳ１遺伝子発現の阻害を達成するために、宿主細胞に送達され得る。したがって、リボザイムなどは、真核生物のプロモーター（例えば、真核生物のウイルスプロモーター）に連結されるリボザイムをコードするＤＮＡによってこの宿主細胞に送達され得、したがって、核中への導入により、このリボザイムは、直接転写される。

【０２２６】

（ＲＮＡｉ）

本発明はまた、部分的な２本鎖性質もしくは完全な２本鎖性質を有するＲＮＡの、細胞または細胞外環境中への導入を提供する。阻害は、ＯＡＳ１発現に対して特異的であり、ここで標的ＯＡＳ１遺伝子の部分由来のヌクレオチド配列が阻害性のＲＮＡを生成するために選択される。このプロセスは、（１）遺伝子発現の阻害を生じるのに有効であり、そして（２）標的化されたＯＡＳ１遺伝子に対して特異的である。この手順は、標的ＯＡＳ１遺伝子に機能の部分的な喪失または完全な喪失を与える。少なくとも９９％の、標的化された細胞における遺伝子発現の減少または喪失が、他の標的遺伝子を用いる同等の技術を使用して示された。より低い用量の注射用物質およびｄｓＲＮＡの投与後のより長い時間は、より少ない部分の細胞における阻害を生じ得る。細胞中の遺伝子発現の定量化は、標的ｍＲＮＡの蓄積のレベルまたは標的タンパク質の翻訳のレベルにおける、同様の量の阻害を示し得る。ＲＮＡｉを調製する方法およびＲＮＡｉを使用する方法は概して、本明

細書中に参考として援用される米国特許第６，５０６，５５９号に開示される。
【０２２７】
上記ＲＮＡは、重合されたリボヌクレオチドの１つ以上の鎖を含み得；それは、リン酸－糖骨格またはヌクレオシドのいずれかに対する修飾を含む。この２本鎖構造は、単一の自己相補性ＲＮＡ鎖、または２つの相補的ＲＮＡ鎖によって形成され得る。ＲＮＡ２重鎖の形成は、細胞の内側または細胞の外側のいずれかで開始され得る。このＲＮＡは、１細胞あたり少なくとも１つのコピーの送達を可能にする量で導入され得る。より高用量の２本鎖物質は、より有効な阻害を与え得る。
【０２２８】
阻害は配列特異的であり、上記ＲＮＡの２重鎖領域に対して対応するヌクレオチド配列が、遺伝子の阻害のために標的化される。上記ＯＡＳ１標的遺伝子の一部分と同一のヌクレオチド配列を含むＲＮＡは、阻害に関して好ましい。この標的配列に対して挿入、欠失および１つの点変異を有するＲＮＡ配列もまた、阻害に関して有効であることが見出された。したがって、配列同一性は、当該分野において公知のこのヌクレオチド配列間の違いの存在を計算しアライメントアルゴリズムによって最適化され、得る。あるいは、このＲＮＡの２重鎖領域は、標的遺伝子転写物の一部分とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列として機能的に定義され得る。
【０２２９】
ＲＮＡは、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて合成され得る。その細胞の内因性のＲＮＡポリメラーゼが、インビボにおいて転写を媒介し得るか、またはクローニングされたＲＮＡポリメラーゼが、インビボもしくはインビトロにおける転写のために使用され得る。インビボの導入遺伝子または発現構築物由来の転写に関して、調節領域は、このＲＮＡ鎖（単数または複数）を転写するのに使用され得る。
【０２３０】
ＲＮＡｉに関して、このＲＮＡは、この細胞中に（すなわち、細胞内に）直接導入されても、窩洞中、間質腔中、生物の循環中に対して、細胞外に導入されても、経口的に導入されても、ＲＮＡを含む溶液中に生物を浴することによって導入されてもよい。経口的導入のための方法としては、ＲＮＡとその生物の食物との直接的混合、ならびに食物として使用される種がＲＮＡを発現するように操作され、その後、影響を受けるべき生物に食べられる、操作されたアプローチが挙げられる。核酸を導入する物理的方法としては、ＲＮＡ溶液の、細胞中への直接的な注入、またはこの生物中への細胞外の注入が挙げられる。
【０２３１】
この方法の利点としては、２本鎖ＲＮＡを細胞中へ導入する容易性、使用され得るＲＮＡの低い濃度、２本鎖ＲＮＡの安定性、および上記阻害の有効性が挙げられる。
【０２３２】
遺伝子発現の阻害は、ＯＡＳ１標的遺伝子由来のタンパク質および／またはｍＲＮＡ産物のレベルの欠如（または観察可能な減少）を与える。特異性は、この細胞の他の遺伝子における明白な効果を伴わずに標的遺伝子を阻害する能力を与える。阻害の結果は、この細胞もしくは生物の見かけ上の特性の検査によってか、または生化学的技術（例えば、ＲＮＡ溶液ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、ノーザンハイブリダイゼーション、逆転写、マイクロアレイを用いた発現のモニタリング、抗体の結合、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロッティング、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、他の免疫アッセイ、および蛍光活性細胞分析（ＦＡＣＳ）によって確認され得る。細胞株または生物体全体におけるＲＮＡ媒介性の阻害に関して、遺伝子発現は、タンパク質産物が容易にアッセイされるレポーターまたは薬物抵抗性遺伝子の使用によって、都合良くアッセイされる。このようなレポーター遺伝子としては、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（ＡＨＡＳ）、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）、βガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、βグルクロニダーゼ（ＧＵＳ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）、ノパリンシンターゼ（ＮＯＳ）、オクトピンシンターゼ（ＯＣ

Ｓ）、およびそれらの誘導体が挙げられる。アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノスリシン、ピューロマイシン、およびテトラサイクリンに対する抵抗性を与える複数の選択可能なマーカーは、利用可能である。

【０２３３】

上記アッセイに依存して、遺伝子発現の量の定量化は、本発明にしたがって処理されない細胞と比較して、１０％、３３％、５０％、９０％、９５％または９９％より大きい阻害の程度を決定させる。より低い用量の注入用物質およびｄｓＲＮＡの投与後の、より長い時間は、より少ない割合の細胞における阻害を生じ得る（例えば、標的化された細胞の、少なくとも１０％、２０％、５０％、７５％、９０％、または９５％）。

【０２３４】

細胞中のＯＡＳ１遺伝子発現の定量化は、ＯＡＳ１標的ｍＲＮＡの蓄積のレベルまたはＯＡＳ１標的タンパク質の翻訳のレベルにおいて、同様の量の阻害を示す。例として、阻害の有効性は、この細胞中の遺伝子産物の量を評価することによって決定され得る：ｍＲＮＡは、阻害性の２本鎖ＲＮＡとして使用される領域の外側にヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって検出され得る。または翻訳されたポリペプチドは、その領域のポリペプチド配列に対してもたらされた抗体によって検出され得る。

【０２３５】

上記ＲＮＡは、１つ以上の重合したリボヌクレオチドの鎖を含み得る。それは、リン酸－糖骨格またはヌクレオシドのいずれかに対する修飾を含み得る。例えば、天然のＲＮＡのホスホジエステル結合は、少なくとも１つの窒素ヘテロ原子または硫黄ヘテロ原子を含むように修飾され得る。ＲＮＡ構造中の修飾は、ｄｓＲＮＡによって引き起こされるいくつかの生物における一般的なパニック反応（ｐａｎｉｃ　ｒｅｓｐｏｎｓｅ）を回避しつつ、特異的な遺伝子の阻害を可能にするのに適切であり得る。同様に、塩基は、アデノシンデアミナーゼの活性を遮断するために修飾され得る。ＲＮＡは、酵素的に生成されても、部分的／完全有機合成によって生成されてもよく、任意の修飾されたリボヌクレオチドは、インビトロの、酵素的合成または有機合成によって導入され得る。

【０２３６】

上記２本鎖構造は、単一の自己相補性ＲＮＡ鎖または２つの相補的ＲＮＡ鎖によって形成され得る。ＲＮＡ２重鎖の形成は、その細胞の内側または細胞の外側のいずれかで開始され得る。このＲＮＡは、１細胞あたり少なくとも１つのコピーの送達を可能にする量で導入され得る。より高い用量（例えば、１細胞あたり少なくとも５コピー、１０コピー、１００コピー、５００コピーまたは１０００コピー）の２本鎖物質は、より有効な阻害を与え得る；より低い用量もまた、特定の適用について有用である。阻害は、配列特異的であり、上記ＲＮＡの２重鎖領域に対して対応するヌクレオチド配列は、遺伝子の阻害のために標的化される。

【０２３７】

上記ＯＡＳ１標的遺伝子の一部分と同一のヌクレオチド配列を含むＲＮＡは、阻害に関して好ましい。この標的配列に対して、挿入、欠失、および１つの点変異を有するＲＮＡ配列は、阻害に関して有効であり得る。したがって、配列同一性は、当該分野において公知の配列比較およびアライメントアルゴリズム（ＧｒｉｂｓｋｏｖおよびＤｅｖｅｒｅｕｘ，Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｐｒｉｍｅｒ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，１９９１年，ならびにその中に引用される参考を参照のこと）によって最適化され、そして例えば、初期値パラメーター（例えば、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ）を使用するＢＥＳＴＦＩＴソフトウェアプログラム中に使用されるようなＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムによって、このヌクレオチド配列間の違いのパーセントを計算し得る。上記阻害性ＲＮＡとこのＯＡＳ１標的遺伝子の一部との間の、９０％より大きい配列同一性、または１００％の配列同一性でさえも好ましい。あるいは、このＲＮＡの２重鎖領域は、ＯＡＳ１標的遺伝子転写物の一部分とハイブリダイズし得るヌクレオチド配列として機能的に定義

され得る（例えば、４００ｍＭのＮａＣｌ、４０ｍＭのＰＩＰＥＳ（ｐＨ６．４）、１ｍＭのＥＤＴＡ、５０℃または７０℃にて１２～１６時間のハイブリダイゼーション；その後、洗浄される）。この同一のヌクレオチド配列の長さは、少なくとも２５塩基、５０塩基、１００塩基、２００塩基、３００塩基または４００塩基であり得る。

【０２３８】

上記ＲＮＡとＯＡＳ１標的遺伝子との間の１００％の配列同一性は、本発明の実施に必要とされない。したがって、この方法は、遺伝子変異、血統の多型または進化的分岐に起因して予測され得る配列を許容し得る利点を有する。

【０２３９】

ＯＡＳ１　ＲＮＡは、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて合成され得る。その細胞の内因性のＲＮＡポリメラーゼが、インビボにおいて転写を媒介し得るか、またはクローニングされたＲＮＡポリメラーゼが、インビボもしくはインビトロにおける転写のために使用され得る。インビボの導入遺伝子または発現構築物由来の転写に関して、調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、スプライシングドナーおよびスプライシングアクセプター、ポリアデニル化）は、このＲＮＡ鎖（単数または複数）を転写するのに使用され得る。阻害は、生物、組織、もしくは細胞型、環境条件の刺激（例えば、感染、ストレス、温度、化学的誘発物質）、および／または発達段階もしくは年齢にて転写を操作する工程における特定の転写によって標的化され得る。このＲＮＡ鎖は、ポリアデニル化されてもされなくてもよく、このＲＮＡ鎖は、細胞の翻訳装置によってポリペプチドに翻訳されてもよく翻訳され得なくてもよい。ＲＮＡは、手動の反応または自動化された反応によって、化学的または酵素的に合成され得る。ＲＮＡは、細胞のＲＮＡポリメラーゼまたはバクテリオファージのＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ３、Ｔ７、ＳＰ６）によって合成され得る。発現構築物の使用および生成は、当該分野において公知である（（ＷＯ　９７／３２０１６；米国特許第５，５９３，８７４号、同第５，６９８，４２５号、同第５，７１２，１３５号、同第５，７８９，２１４号、および同第５，８０４，６９３号；ならびにその中に引用される参考を参照のこと）。化学的かまたはインビトロでの酵素的合成によって合成される場合、このＲＮＡは、上記細胞中への導入前に精製され得る。例えば、ＲＮＡは、溶媒または樹脂を用いる抽出、沈殿、電気泳動、クロマトグラフィー、またはそれらの組み合わせによって混合物から精製され得る。あるいは、このＲＮＡは、そのままで使用され得るか、または試料の処理に起因する損失を回避するため最小限の精製で使用され得る。このＲＮＡは、保存のために乾燥されても水溶液中に溶解されてもよい。この溶液は、アニーリングを促進する、緩衝液もしくは塩、および／もしくは２重鎖の安定化剤を含み得る。

【０２４０】

ＲＮＡは、この細胞中（すなわち、細胞内に）に直接導入されてもよく、あるいは窩洞中、間質腔中、生物の循環中に対して、細胞外に導入されても、経口的に導入されても、またはＲＮＡを含む溶液中に生物を浴することによって導入されてもよい。経口的導入のための方法としては、ＲＮＡとその生物の食物との直接的混合、ならびに食物として使用される種がＲＮＡを発現するように操作され、その後、影響を受けるべき生物に食べられる、操作されたアプローチが挙げられる。例えば、このＲＮＡは、植物上に噴射され得るか、または植物が、その植物に感染する公知の病原体の、いくつかまたは全てを殺傷するのに十分な量のこのＲＮＡを発現するように遺伝子的に操作され得る。核酸を導入する物理的方法（例えば、細胞中への直接的な注入、またはこの生物中への細胞外の注入）もまた使用され得る。血管循環または血管外循環、血液系またはリンパ系、および脳脊髄液は、上記ＲＮＡが導入される部位である。組換え構築物由来のＲＮＡを発現するトランスジェニック生物は、接合体、胚性幹細胞、または適切な生物に由来する別の多分化能細胞中にこの構築物を導入することによって産生され得る。

【０２４１】

核酸を導入する物理的方法としては、ＲＮＡを含む溶液の注入、このＲＮＡによって覆われた粒子による砲撃（ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）、このＲＮＡの溶液中に細胞または生

物を浸漬すること、このＲＮＡの存在下における細胞膜のエレクトロポレーションが挙げられる。ウイルス粒子中に詰められたウイルス構築物は、細胞中への発現構築物の効率的な導入、およびこの発現構築物によってコードされたＲＮＡの転写の両方によって達成され得る。脂質媒介性のキャリア輸送、化学物質媒介性の輸送（例えば、リン酸カルシウム）などのような、細胞に核酸を導入するための、当該分野において公知である他の方法が使用され得る。したがって、このＲＮＡは、以下の１つ以上の活性を果たす構成要素と一緒に導入され得る：この細胞によるＲＮＡ取り込みの向上、この２重鎖のアニーリングの促進、このアニールされた鎖の安定化、またはこの標的遺伝子の他の阻害向上。

【０２４２】

本発明は、単独で使用されも、試験試料もしくは試験被検体に対する、ＲＮＡのインビトロまたはインビボでの導入を行うのに必要な少なくとも１つの試薬を有するキットの構成要素として使用されてもよい。好ましい構成要素は、上記ｄｓＲＮＡ、およびこのｄｓＲＮＡの導入を促すビヒクルである。このようなキットはまた、このキットの使用者に本発明を実施させるための説明書を備え得る。

【０２４３】

適切な注入混合物は、動物が平均して０．５×１０^{6}～１．０×１０^{6}個のＲＮＡ分子を受け取るように構築される。センス活性、アンチセンス活性、およびｄｓＲＮＡ活性の比較のため、注入は、等しい質量のＲＮＡと比較される（すなわち、この１本鎖の半分のモル濃度でのｄｓＲＮＡ）。成人１人あたりに注入される分子の数は、注入される物質中のＲＮＡの濃度（エチジウムブロマイド染色から見積もられる）および注入容量（注入の部位における目に見える置き換えから見積もられる）に基づく概算として与えられる。個々の動物間において、注入容量の数倍の変動が可能である。

【０２４４】

（タンパク質およびポリペプチド）

本明細書中に開示されるアンチセンス分子およびリボザイムに加えて、本発明のＯＡＳ１インヒビターとしてはまた、ＯＡＳ１遺伝子の発現を減少させるのに有効であるか、または１つ以上のＯＡＳ１の生物学的活性（酵素活性、１本鎖ＲＮＡとの相互作用、立体配置、およびＣ型肝炎ウイルスのＮＳ５Ａまたはそのフラグメントのような他のタンパク質との結合が挙げられるが、これらに限定されない）を減少させるのに有効な、タンパク質またはポリペプチドが挙げられる。当業者が、慣習的な実験を通じてこのようなＯＡＳ１インヒビターを迅速に同定し得る種々の方法は、当該分野で容易に利用できる。本発明は、以下の例示的な方法論に限定されない。

【０２４５】

タンパク質－タンパク質相互作用を検出および分析するための方法を記載する文献は、当業者にとって利用可能である。本明細書中で参考として援用されるＰｈｉｚｉｃｋｙら，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　５９：９４－１２３，１９９５年における総説。このような方法としては、例えば、タンパク質親和性クロマトグラフィー、アフィニティーブロッティング、免疫沈降および架橋結合のような物理的方法、ならびに、例えば、タンパク質プローブ、ファージディスプレイおよび２－ハイブリッドスクリーニングのようなライブラリーに基づく方法が挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質－タンパク質相互作用を同定するのに利用され得る他の方法としては、遺伝子外のサプレッサー、合成的な致死効果および結合されない非相補性の使用のような遺伝子的な方法が挙げられる。例示的な方法は、以下でさらに詳細に記載される。

【０２４６】

本発明のＯＡＳ１インヒビターは、ＯＡＳ１タンパク質と、有力なインヒビタータンパク質のパネルまたはライブラリーとの間の、直接的な相互作用に依存する生物学的スクリーニングアッセイを介して同定され得る。種々の「ｎ－ハイブリッド技術」を含む生物学的スクリーニング方法は、例えば、Ｖｉｄａｌら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２７（４）：９１９－２９，１９９９年；Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋｓｏｎ，Ｒ．Ｍ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９（１）：９０－９６，１９９８年；Ｂｒａｃｈｍａ

ｎｎら，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８（５）：５６１－６８，１９９７年；およびＷｈｉｔｅ，Ｍ．Ａ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９３：１０００１－０３，１９９６年に記載され、これらは各々、本明細書中に参考として援用される。

【０２４７】

この２－ハイブリッドスクリーニング方法論は、阻害性特性を有するＯＡＳ１結合タンパク質についての、新しい標的ｃＤＮＡライブラリーまたは既存の標的ｃＤＮＡライブラリーを調査するために利用され得る。この２－ハイブリッドシステムは、レポーター遺伝子の転写の増加よってタンパク質－タンパク質相互作用を検出する遺伝子的方法である。このシステムは、部位特異的転写活性化因子が、ＤＮＡ結合ドメインおよび転写活性化ドメインを有するという事実に依存する。このＤＮＡ結合ドメインは、発現される特定の遺伝子に対する活性化ドメインを標的化する。転写活性化因子のモジュール状の性質に起因して、ＤＮＡ結合ドメインは、いずれのドメインの活性の損失も伴わずに、転写活性化ドメインから共有結合的に切断され得る。さらに、これらの２つのドメインは、転写機構に関連しない２つのタンパク質間の、タンパク質とタンパク質との接触によって、近位にもたらされ得る。したがって、２つのハイブリッドは、機能的システムを形成するために構築される。第１のハイブリッド（すなわち、餌）は、目的のタンパク質に対して融合される転写活性化因子のＤＮＡ結合ドメインからなる。第２のハイブリッド（標的）は、タンパク質またはポリペプチドのライブラリーを用いる転写活性化ドメインの融合によって形成される。この餌タンパク質とこの標的ライブラリーのメンバーとの間の相互作用は、ＤＮＡ結合ドメインと転写活性化因子ドメインとの近接および結果的なレポーター遺伝子の発現の上方制御を生じる。

【０２４８】

種々の２－ハイブリッドに基づくシステムは、当業者にとって利用可能であり、当業者は、酵母のＧａｌ４またはＥ．ｃｏｌｉのＬｅｘＡ　ＤＮＡ結合ドメイン（ＢＤ）、および酵母のＧａｌ４または単純ヘルペスウイルスのＶＰ１６転写活性化ドメインのいずれかを最も一般的に利用する。Ｃｈｉｅｎら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８８：９５７８－８２，１９９１年；Ｄａｌｔｏｎら，Ｃｅｌｌ　６８：５９７－６１２，１９９２年；Ｄｕｒｆｅｅら，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．７：５５５－６９，１９９３年；Ｖｏｊｔｅｋら，Ｃｅｌｌ　７４：２０５－１４，１９９３年；およびＺｅｒｖｏｓら，Ｃｅｌｌ　７２：２２３－３２，１９９３年。一般的に使用されるレポーター遺伝子としては、Ｅ．ｃｏｌｉのｌａｃＺ遺伝子、ならびにＨＩＳ３およびＬＥＵ２のような選択可能な酵母遺伝子が挙げられる。Ｆｉｅｌｄｓら，Ｎａｔｕｒｅ（Ｌｏｎｄｏｎ）３４０：２４５－４６，１９８９年；Ｄｕｒｆｅｅ，Ｔ．Ｋ．，上述；およびＺｅｒｖｏｓ，Ａ．Ｓ．，上述。多種多様な活性化ドメインのライブラリーは、当該分野において容易に利用でき、したがって、相互作用するタンパク質についてのスクリーニングが、慣習的な実験を介して行われるような。

【０２４９】

ＯＡＳ１相互作用タンパク質を同定するための適切な餌タンパク質は、配列番号１９として本明細書中に提示されるＯＡＳ１　ＤＮＡ配列に基づいて設計される。このような餌タンパク質としては、完全長のＯＡＳ１タンパク質またはそのフラグメントのいずれかが挙げられる。

【０２５０】

例えば、ｐＢＴＭ１１６およびｐＡＳ２－１のような、ＯＡＳ１の餌構築物および標的ライブラリーを調製するためのプラスミドベクターは、当業者にとって容易に入手可能であり、そして、例えば、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ（Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ）、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）およびＳｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）のような販売元から入手され得る。これらのプラスミドベクターは、それぞれ、ＬｅｘＡまたはＧａｌ４ＢＤのようなＤＮＡ結合ドメインとｃＤＮＡとの、インフレームの融合を可能にする。

【０２５１】
本発明のＯＡＳ１インヒビターは、タンパク質－タンパク質相互作用を検出するための、あるいは、当該分野において利用可能な、物理的方法または生化学的方法の１つを介して同定され得る。
【０２５２】
上記タンパク質アフィニティークロマトグラフィー方法論を介して、潜在的ＯＡＳ１インヒビターのような試験されるべきリード化合物が、例えばセファロースビーズのような固体マトリックスに対して共有結合されるかまたは非共有結合で結合される場合の、ＯＡＳ１に対する特異的保持によって同定され得る。タンパク質アフィニティーカラムの調製は、例えば、Ｂｅｅｃｋｍａｎｓら，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１１７：５２７－３５，１９８１年，およびＦｏｒｍｏｓａら，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．２０８：２４－４５，１９９１年に記載される。細胞タンパク質の全てを含む細胞溶解物は、ＯＡＳ１アフィニティーカラムに通され得る。ＯＡＳ１に対して高い親和性を有するタンパク質は、低濃度の塩条件下で保持される一方で、細胞のタンパク質の大部分は、カラムを通過する。このような高い親和性のタンパク質は、カオトロピックな溶媒またはドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を用いる高塩濃度の条件下で、固定されたＯＡＳ１から溶出され得る。いくつかの実施形態において、ＯＡＳ１特異的結合タンパク質を同定するのに役立つような溶解物を調製する前に、上記細胞を放射標識することが好まれ得る。哺乳動物細胞を放射標識するための方法は、当該分野において公知であり、そして、例えば、Ｓｏｐｔａら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６０：１０３５３－６０，１９８５年に提供される。
【０２５３】
アフィニティーカラムクロマトグラフィーに対して適切なＯＡＳ１タンパク質は、適切な親和性樹脂上の迅速な精製を可能にするために、タンパク質またはポリペプチドに対して融合され得る。例えば、ＯＡＳ１　ｃＤＮＡは、グルタチオン－アガロースカラムに対する融合タンパク質の吸着を容易にするグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）についてのコード領域に融合され得る。Ｓｍｉｔｈら，Ｇｅｎｅ　６７：３１－４０，１９８８年。あるいは、融合タンパク質は、免疫グロブリンＧを有するカラム上で精製され得るプロテインＡ、$Ｎｉ^{2+}$を有するカラム上で精製され得るオリゴヒスチジン含有ペプチド、アミロースを含む樹脂上で精製され得るマルトース結合タンパク質、およびメトトレキサートカラム上で精製され得るジヒドロ葉酸レダクターゼを含み得る。本明細書中に提示されるＯＡＳ１融合タンパク質の調製に適した１つの例示的なタグは、モノクローナル抗体が容易に利用でき、そしてそこからアフィニティーカラムの抗体が調製され得る、インフルエンザウイルス赤血球凝集素（ＨＡ）ついてのエピトープである。
【０２５４】
ＯＡＳ１アフィニティーカラム上に保持されるタンパク質は、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）に供される工程の後に同定され得る。したがって、細胞は、細胞溶解物の調製およびＯＡＳ１アフィニティーカラムの通過前に放射標識され、ＯＡＳ１に対して高い親和性を有するタンパク質は、オートラジオグラフィーによって検出され得る。ＯＡＳ１特異的結合タンパク質の同一性は、Ｍａｔｈｅｗｓ，Ｃ．Ｋ．ら，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｔｈｅ　Ｂｅｎｊａｍｉｎ／Ｃｕｍｍｉｎｇｓ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｉｎｃ．，１９９０年，１６６－７０ページのような当業者にとって容易に利用できるタンパク質配列決定技術によって決定され得る。
【０２５５】
（小分子）
本発明はまた、ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）方法論の慣習的な適用を通じて容易に同定され得る、小分子ＯＡＳ１インヒビターを提供する。Ｐｅｒｓｉｄｉｓ，Ａ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１６：４８８－８９，１９９８年による総説。ＨＴＳ法とは一般的に、リード化合物（例えば、小分子）の治療的可能性についての迅速なアッセイを可能にするこれらの技術を指す。ＨＴＳ方法論は、試験物質陽性

シグナルの検出およびデータの解析のロボット操作を利用する。このような方法論としては、例えば、可溶性分子ならびに上に詳細に記載される２－ハイブリッドシステムのような細胞に基づくシステムを使用するロボット利用のスクリーニング技術が挙げられる。

【０２５６】

種々の細胞株に基づくＨＴＳ法は、それらの操作の容易さ、および溶液中とは対照的に細胞環境内で起こる相互作用の臨床上の関連性からくる利益を利用できる。リード化合物は、放射活性の取り込みを介して同定されても読み出し値としての吸光度、蛍光、または発光に依存する光学的アッセイによって同定されてもよい。例えば、本明細書中に参考として援用される、Ｇｏｎｚａｌｅｚら，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９（６）：６２４－３１，１９９８年を参照のこと。

【０２５７】

ＨＳＴ方法論は、例えば、ＯＡＳ１の生物学的活性の１つを遮断するリード化合物についてスクリーニングするために利用され得る。この方法によって、ＯＡＳ１タンパク質は、このタンパク質を発現する細胞から免疫沈降され、そしてロボットを利用したスクリーニングに適したアッセイプレート上のウェルに適用され得る。その後、個々の試験化合物は、免疫沈降したタンパク質と接触され得、そしてＯＡＳ１に対する各試験化合物の効果と関係付けられる。

【０２５８】

（ＯＡＳ１インヒビターの効力を評価するための方法）

リード分子またはリード化合物（アンチセンス分子またはリボザイムであっても、タンパク質および／またはペプチドであっても、抗体および／または抗体フラグメントあるいは小分子であっても）は、本明細書に記載される方法の１つによってか、またはそうでなければ当該分野において利用可能な技術を介して、種々のインビトロ、エキソビボ、およびインビボの動物モデルアッセイシステム中で、これらのＯＡＳ１遺伝子発現を阻害する能力またはこれらの生物学的活性について、さらに特徴付けられ得る。以下に提供される実施例おいてさらに詳細に議論されるように、本発明のＯＡＳ１インヒビターは、ＯＡＳ１の発現レベルを減少するのに有効である。したがって、本発明は、当業者に候補のインヒビターの効果を評価させる方法を、さらに開示する。

【０２５９】

候補のＯＡＳ１インヒビターは、内因性のＯＡＳ１を発現する細胞、または組換えＯＡＳ１プラスミド構築物を用いる哺乳動物細胞のトランスフェクションによってＯＡＳ１を発現するように作製される細胞に対する投与によって試験され得る。

【０２６０】

有効なＯＡＳ１阻害性分子は、ＯＡＳ１の酵素活性、またはＩＦＮ誘導に対して応答するＯＡＳ１の能力を減少させるのに有効である。ＯＡＳ１酵素活性およびＩＦＮ誘導を測定する方法は、例えば、本明細書中に参考として援用されるＥｓｋｉｌｄｓｅｎら，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３１：３１６６－３１７３，２００３年；およびＪｕｓｔｅｓｅｎら，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．８：３０７３－３０８５，１９８０年に記載されるように、当該分野において公知である。所与の候補アンチセンス分子の有効性は、哺乳動物細胞に対して投与したとき、ＯＡＳ１発現に対して実質的な効果を有さないことが公知である、対照「アンチセンス」分子との比較によって評価され得る。

【０２６１】

上で議論される１つ以上の方法によってＯＡＳ１遺伝子発現を減少するのに有効なＯＡＳ１インヒビターは、デング熱ウイルスのようなフラビウイルスによる感染によって負荷されたＶｅｒｏ細胞の使用に関連して、本明細書中に記載されるような容易に利用可能な確立された細胞培養または初代細胞培養モデルシステムのうちの１つにおける有効性について、インビトロでさらに特徴付けられ得る。

【０２６２】

（薬学的組成物）

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムは、リボヌクレオチドのヌ

クレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのヌクレオチドについて当該分野において公知である任意の方法によって合成され得る。例えば、このオリゴヌクレオチドは、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３８０Ｂ　ＤＮＡ合成機におけるような固相合成を使用して調製され得る。このオリゴヌクレオチドの最終的な純度は、当該分野において公知である通りに決定される。

【０２６３】

本発明の方法を使用して同定されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、腫瘍細胞の増殖を調節する。したがって、薬学的組成物および方法が、ウイルス感染（好ましくはフラビウイルス感染、最も好ましくはＨＣＶ感染）を妨害するために提供され、これらは、本発明の方法を使用して同定された１つ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドと組織または細胞とを接触させる工程を包含する。

【０２６４】

本発明は、治療的適用のための活性成分として、上記ＯＡＳ１　ｍＲＮＡの遺伝子配列に対して相補的な、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの薬学的組成物を提供する。これらの組成物はまた、本発明の方法に使用され得る。必要な場合、上記化合物は、ヌクレアーゼ抵抗性である。一般的に、哺乳動物においてウイルス感染を阻害するための上記薬学的組成物は、本発明の実施のために必要とされる、少なくとも１種の上記のようなアンチセンスオリゴヌクレオチド、または同じ効果を有することが示されたそのフラグメントの有効量を含み、そしてこの組成物は、薬学的かつ生理学的に受容可能な、キャリアまたは希釈剤を含有する。

【０２６５】

この組成物は、経口的か、皮下か、または非経口的（静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、および鼻腔内投与を含み、そして必要な場合、鞘内技術および注入技術を含む）に投与され得る。薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、アジュバントおよびビヒクル、ならびに移植キャリアは、一般的に、本発明の活性成分と反応しない、不活性であり無毒性の、固体賦形剤または液体充填剤、希釈剤またはカプセル化用物質を指す。カチオン性脂質もまた、オリゴヌクレオチドの取り込みを容易にするために、この組成物中に含まれ得る。この化合物の移植物もまた有用である。一般的に、この薬学的組成物は、無菌である。

【０２６６】

生物活性（発現可能）によって、上記オリゴヌクレオチドが、上記細胞に直接送達され、そして／または適切なプロモーターによって発現される場合に、この細胞中で生物学的に活性であり、そして以下に記載されるようなベクターにおいてこの細胞に送達される場合に活性であることが意味される。ヌクレアーゼ抵抗性は、本明細書中に記載されるような生物学的活性に対して実質的に干渉しない、当該分野において公知である方法のいずれかによって提供される。

【０２６７】

「細胞と接触する工程」とは、直接であろうと、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターによってであろうと、細胞に対して、アンチセンスオリゴヌクレオチドを曝すかまたは送達し、このアンチセンスオリゴヌクレオチドが、送達の際に生物活性である方法をいう。

【０２６８】

本発明のヌクレオチド配列は、直接的にか、またはウイルスベクターもしくは非ウイルスベクターによって送達され得る。直接送達される場合、この配列は概して、ヌクレアーゼ抵抗性を与えられる。あるいは、上記配列は、この配列がその細胞中で発現されるような、発現カセットまたは発現構築物中に組み込まれ得る。一般的に、この構築物は、その標的化された細胞中で上記配列を発現させる、適切な調節配列または適切なプロモーターを含む。

【０２６９】

一旦、上記オリゴヌクレオチド配列が、送達される状態になると、それらは、当該分野

において公知であるように、細胞中に導入され得る。トランスフェクション、エレクトロポレーション、融合、リポソーム、コロイド性ポリマー粒子、およびウイルスベクター、ならびに当該分野において公知である他の手段は、上記細胞にオリゴヌクレオチド配列を送達するのに使用され得る。選択された方法は、少なくとも、処理される細胞、およびこの細胞の配置に依存し、そしてこのことは、当業者にとって公知である。局在化は、このリポソームを方向づけるためのその表面上に特異的マーカーを有するリポソームによってか、標的細胞を含む組織中に直接注入することによってか、標的細胞と空間的に近くでデポーを会合させることによってか、特定のレセプターを媒介する取り込み、ウイルスベクターなどによって達成され得る。

【０２７０】

本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド配列に作動可能に連結された発現制御配列を含むベクターを提供する。本発明は、適切な真核生物細胞および適切な原核生物細胞から選択される宿主細胞をさらに提供し、これらは、必要な場合にこれらのベクターによって形質転換される。

【０２７１】

ベクターは、当業者にとって公知であるか、または当業者によって構築され、そして上記配列の所望の転写を達成するのに必要な、全ての発現要素を含むべきである。異なる形態のオリゴヌクレオチドの回収のための機構のような、他の有益な特徴はまた、ベクター中に含まれ得る。ファージミドは、このような有益なベクターの具体的な例である。なぜなら、それらは、プラスミドベクターとしてかまたはバクテリオファージベクターとして使用され得るからである。他のベクターの例としては、バクテリオファージ、バキュロウイルス、およびレトロウイルスのようなウイルス、ＤＮＡウイルス、リポソームならびに他の組換えベクターが挙げられる。このベクターはまた、原核生物宿主系または真核生物宿主系のいずれかに使用するための要素を含み得る。当業者は、宿主系が、特定のベクターと適合性であることを理解する。

【０２７２】

上記ベクターは、当該分野において公知の種々の方法のいずれか１つによって、細胞または組織中に導入され得る。このような方法は、一般にＳａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９年，１９９２年；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，ＭＤ，１９８９年のＡｕｓｕｂｅｌら；Ｃｈａｎｇら，Ｓｏｍａｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，Ｍｉｃｈ．，１９９５年；Ｖｅｇａら，Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，Ｍｉｃｈ．，１９９５年；Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｕｓｅｓ，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，Ｍａｓｓ．，１９８８年；およびＧｉｌｂｏａら，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：５０４－１２，１９８６年に記載されることが見出され、そして、この方法としては、例えば、組換えウイルスベクターを用いる、安定的または一過性の、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび感染が挙げられる。

【０２７３】

当該分野において公知である組換え方法はまた、標的核酸のアンチセンス阻害を達成するために使用される。例えば、アンチセンス核酸を含むベクターは、上記標的核酸の発現を減少させ、それによってその活性を減少させるアンチセンスメッセージを発現するために利用され得る。

【０２７４】

本発明はまた、化合物が、ＯＡＳ１遺伝子の転写または翻訳を阻害し、それによってＲＮａｓｅＬを活性化する細胞の能力を調節する（すなわち、減少させる）か否かを評価する方法を提供し、この方法は、ＯＡＳ１、この核酸の転写または翻訳のために必要な要素

をコードする核酸配列を含む発現ベクターによって、細胞をトランスフェクトする工程、試験化合物を投与する工程、およびこの試験化合物の非存在下で対照によって得られた発現のレベルと、このＯＡＳ１の発現のレベルとを比較する工程を包含する。

【０２７５】

（好ましい実施形態）

上記の方法および当該分野において公知である他の方法を利用して、本発明は、増幅条件下で、オリゴアデニレートシンセターゼ（ＯＡＳ１、配列番号１９）のオリゴヌクレオチド（ｎｔ）位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８のいずれかを含むヒトゲノムＤＮＡの領域を増幅するためのＰＣＲプライマー対によって、ヒトから単離されたゲノムＤＮＡの試料を処理する工程を包含するスクリーニング方法を企図する。増幅条件としては、ＤＮＡ合成のために有効な量のＰＣＲ緩衝液の存在、および温度循環の温度が挙げられる。したがって、このＰＣＲ産物は、関連するヌクレオチド位置における点変異の存在についてアッセイされる。１つの実施形態において、このＰＣＲ産物は、５’方向から３’方向に書き込まれた約３５８塩基対（ｂｐ）を含み、そして位置２１３５７２８（変異１）、２１３５７４９（変異２）、２１３５９７８（変異３）、２１４４０７２（変異４）、２１４４０８８（変異５）、２１４４１１６（変異６）、または２１４４３２１（変異７）および各側における位置に隣接する約１７５塩基を含む連続したヌクレオチド配列を含む。別の実施形態において、表１および表２における上記のような単位複製配列は、例示的なＰＣＲ産物および対応するプライマーである。

【０２７６】

１つの好ましい実施形態において、このＰＣＲ産物は、ハイブリダイゼーション条件下で、対応する変異に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いてこの増幅産物を処理し、そして任意のハイブリダイゼーション産物の形成を検出することによって対応する変異についてアッセイされる。好ましいオリゴヌクレオチドプローブは、以下の表３に示されるヌクレオチド配列を含む。標的核酸に対するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、米国特許第４，５３０，９０１号に記載される。

【０２７７】

【表３】

表3

変異配列番号	プローブ配列
配列番号1	GTAGATTTTGCCYGAACAGGTCAGT (配列番号12)
配列番号2	CAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTA (配列番号13)
配列番号3	CAGAGGAGGGGTRGGGGGAGGAGA (配列番号14)
配列番号4	TCTCACCCTTTCARGCTGAAAGCAAC (配列番号15)
配列番号5	GAAAGCAACAGTRCAGACGATGAGA (配列番号16)
配列番号6	ACGATCCCAGGASGTATCAGAAATAT (配列番号17)
配列番号7	TTGATCCAGAGARGACAAAGCTCCTC (配列番号18)

ここでR=A/G, S=C/G, およびY=C/T

したがって、形成されたＰＣＲ混合物は、ＯＡＳ１遺伝子の増幅産物およびＯＡＳ１Ｒ遺伝子の増幅産物を産生する複数のＰＣＲ温度循環に供される。その後、この増幅産物は、ハイブリダイゼーション条件下で、各変異に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いて処理される。その後、任意のハイブリダイゼーション産物が、検出される。

【０２７８】

以下の実施例は、例示することを意図されるが、決して本明細書および特許請求の範囲の限定として解釈されることを意図されない。

【実施例】

【０２７９】

（実施例１）

（ゲノムＤＮＡの調製および予備的スクリーニング）

この実施例は、患者の２つの特定の集団から得たＤＮＡのスクリーニングに関するが、ＨＣＶに対する度重なる曝露が実証され、ここでこの曝露は、感染を生じない他の患者群に対して等しく適用できる。この実施例はまた、上で議論されるような他のフラビウイルスに対して曝された患者のスクリーニングに関し、ここでこの曝露は、感染を生じなかった。

【０２８０】

ここで、２つの集団が研究される：（１）中等度から重篤な血友病の基準、および１９８７年１月より前の濃縮凝固因子の投与によって選択された血友病患者の集団、ならびに（２）１０年間より長い注射の経歴、および使い回しの針のような他の危険行為の証拠を有する静脈内用薬物使用者の集団。この研究は、ＨＣＶに曝露されるがＨＣＶ陰性の患者、およびＨＣＶに曝露され、かつＨＣＶ陽性の患者を含む。

【０２８１】

高分子量ＤＮＡは、ＩＶ薬物使用者、血友病患者、およびＣ型肝炎感染の危険または他のフラビウイルスによる感染の危険にある他の集団から得た白血球から抽出される。ゲノムＤＮＡの最初のスクリーニングに関して、血液は上記の群の患者から、インフォームドコンセント後に収集され、そして０．１４Ｍのクエン酸、０．２Ｍのクエン酸三ナトリウムおよび０．２２Ｍのデキストロースの混合物によって凝血が防がれる。この凝血がふせがれた血液は、室温にて１５分間、８００×ｇにて遠心分離され、そして血小板が多い血漿の上清は廃棄される。ペレットにされた赤血球、単核細胞および多核細胞は、再懸濁され、そして冷却された０．１４Ｍのリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）（ｐＨ７．４）によって最初の血液容量と等しい容量に希釈される。末梢血白血球細胞は、１８℃（１８℃）で１０分間、４００×ｇにて低エンドトキシンＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ．Ｃｏｒｐ．Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．）による遠心分離によって、希釈された細胞懸濁液から回収される。その後、このペレットにされた白血球細胞は、再懸濁され、そして高分子量ＤＮＡの供給源として使用される。

【０２８２】

高分子量ＤＮＡは、当業者にとって周知でありかつＭａｎｉａｔｉｓら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，第2版，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，第９．１６節－第９．２３節，（１９８９）および米国特許第４，６８３，１９５号に記載される方法を使用して、単離された白血球細胞から精製される。

【０２８３】

その後、ＤＮＡの各試料は、オリゴアデニレートシンセターゼ１遺伝子（ＯＡＳ１）に対応するＧｅｎｂａｎｋ登録番号ＮＴ＿００９７７５．１３のヌクレオチド位置を参照して、位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８におけるヌクレオチドのいずれか１つの点変異について検査される。

【０２８４】

（実施例２）

（ＨＣＶ感染に対する抵抗性に関連するＯＡＳ１遺伝子中の変異）

実施例１に記載される方法を使用して、血友病患者および静脈内用薬物使用者に関係のない集団を研究し、そして配列番号１～配列番号７および配列番号５７～配列番号６４に開示されるようなＯＡＳ１における変異の存在または非存在を決定した。

【０２８５】
白色人種集団における２０の事例および４２の対照での研究において、これらの変異を、Ｃ型肝炎感染に対する抵抗性というコンテキストにおいて見出した。ＨＣＶ感染に対する抵抗性と、ＯＡＳ１における点変異の存在との間の、統計学的に有意な相関関係が存在した。
【０２８６】
（実施例３）
（ｃＤＮＡの調製および配列決定）
細胞の全ＲＮＡは、Ｃ型肝炎抵抗性の表現型を有する患者から得た、培養したリンパ芽球または培養した線維芽細胞から精製される。この精製手順は、Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉら，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１６２：１５６－１５９（１９８７）に記載される通りに行われる。要約すると、この細胞は、実施例１に記載されるように調製される。その後、この細胞は、４．０Ｍのグアニジンチオシアネート、０．１ＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、および０．１Ｍのβ－メルカプトエタノールを含む１０ミリリットル（ｍｌ）の変性溶液中でホモジェナイズされ、細胞溶解物を形成する。その後、ラウリルサルコシン酸ナトリウムは、０．５％の最終濃度になるまでこの細胞溶解物に混合され、その後この混合物を室温にて１０分間、５０００×ｇで遠心分離した。この得られた全ＲＮＡを含む上清は、５．７Ｍの塩化セシウムおよび０．０１ＭのＥＤＴＡ（ｐＨ７．５）のクッション上に重層され（ｌａｙｅｒｅｄ）、そして遠心分離によってペレットにされる。この生じたＲＮＡペレットは、１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．６）および０．１％のドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を含む１ｍＭのＥＤＴＡ（ＴＥ）の溶液中に溶解される。フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿の後、この精製された細胞の全ＲＮＡの濃度は、２６０ｎｍにおける吸光度を測定することによって見積もられる。
【０２８７】
上記の調製された全ＲＮＡは、ファーストストランド合成のための、逆転写を使用するｃＤＮＡ合成、および指定された２つの重複フラグメント（５’フラグメントおよび３’フラグメントと称される）においてｃＤＮＡを増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いるＰＣＲのための、鋳型として使用される。本発明の実施に使用されるオリゴヌクレオチドは、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ３８１Ａ ＤＮＡ合成機上で、その製造業者の説明書にしたがって合成される。ＰＣＲは、当該分野において公知の方法を使用して行われる。ＰＣＲ増幅法は、米国特許第４，６８３，１９２号、同第４，６８３，２０２号、同第４，８００，１５９号、および同第４，９６５，１８８号、ならびに少なくとも、ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ＤＮＡ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｈ．Ｅｒｌｉｃｈ編，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９）；およびＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｉｎｎｉｓら編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）を含むいくつかの教科書に記載され、そしてプライマーは、本明細書中の表１に記載される。
【０２８８】
ＨＣＶ感染を有するかまたはＨＣＶ感染を有さない患者由来の、ＰＣＲで増幅されたＤＮＡから直接決定された配列は、分析される。上記ＯＡＳ遺伝子のコード領域より上流の変異の存在は、上記ウイルスに対する度重なる曝露にもかかわらず、ＨＣＶに対して血清陰性である患者において検出され得る。
【０２８９】
（実施例４）
（点変異を含むＰＣＲで増幅されたゲノムＤＮＡの調製および対立遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによる検出）
ヌクレオチド位置２１３５７２８、２１３５７４９、２１３５９７８、２１４４０７２、２１４４０８８、２１４４１１６、２１４４３２１、２１３１０２５、２１３３９６１

、２１３９５８７、２１４４２９４、２１４４９８５、２１５６５２３、２１５６５９５、または２１５６６３８の１つにおける、オリゴアデニレートシンセターゼ（ＯＡＳ１）遺伝子中の点変異は、その変異を含むＰＣＲで増幅されたゲノムＤＮＡが、その領域に対してハイブリダイゼーションしたオリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションによって検出されるアプローチによって決定され得る。オリゴヌクレオチド特異的プローブを用いるハイブリダイゼーションについて、この点変異を有する領域を増幅するために、ＰＣＲ増幅は、例えば、１８０ｎｇの表１に示されるプライマーの各々を用いて、本質的に実施例３に記載される通りに行われる。

【０２９０】

上記ＰＣＲ増幅の後、２μｌの増幅されたオリゴアデニレートシンセターゼＤＮＡ産物は、ニトロセルロースの分離シート上にスポットされる。このスポットされた増幅ＤＮＡは乾燥され、このニトロセルロースは、０．５ＮのＮａＯＨで２分間、１ＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）で２分間処理され、その後、このＤＮＡを変性し、次いで中和するために１．５ＭのＮａＣｌを含む０．５ＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）で２分間処理される。得られたフィルターは８０℃にて１時間、真空下で焼かれ、６Ｘ　ＳＳＣ（１Ｘ＝０．１５ＭのＮａＣｌ、０．１５Ｍのクエン酸ナトリウム）、５Ｘ　Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ溶液（５Ｘ＝０．１％のポリビニルピロリドン、０．１％のフィコールおよび０．１％のウシ血清アルブミン）、５ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０）、０．５ｍｇ／ｍｌのサケ精巣ＤＮＡおよび１％のＳＤＳからなるプレハイブリダイゼーション溶液によって、４２℃にて少なくとも２０分間プレハイブリダイズされる。

【０２９１】

プレハイブリダイゼーション工程の後、このニトロセルロースフィルターは、プレハイブリダイゼーション緩衝液中に希釈された^{32}Ｐ標識オリゴヌクレオチドプローブに対して別個に曝される。^{32}Ｐによるこのプローブの標識は、２．５μｌの１０Ｘ濃度のキナーゼ緩衝液（１０Ｘ＝０．５ＭのＴｒｉｓ［ヒドロキシメチル］アミノメタンヒドロクロリド（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ）（ｐＨ７．６）、０．１Ｍの$MgCl_2$、５０ｍＭのジチオスレイトール（ＤＴＴ）、１ｍＭのスペルミジン－ＨＣｌ，および１ｍＭのエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））、１．１μｌの６０μｇ／μｌの選択されたオリゴヌクレオチド、１８．４μｌの水、２μｌの６０００Ｃｉ／ｍＭのγ^{32}Ｐ　ＡＴＰ（１５０ｍＣｉ／μｌの濃度）、および１μｌの１０Ｕ／μｌポリヌクレオチドキナーゼを混合することによって行われる。この標識混合物は、３７℃にて２０分間維持され、その後、６８℃にて２分間維持される。その後、この維持された混合物は、取り込まれなかった^{32}Ｐ標識ＡＴＰを除去するために、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ５０（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）スピンカラムに適用される。

【０２９２】

上記変異を含む領域に対してハイブリダイズするのに使用されるオリゴヌクレオチドプローブは、上記の表３に示される。下線を引かれたヌクレオチドは、変異ヌクレオチドに対応する野生型（正常）を検出するためのプローブにおいて、下線を引かれたヌクレオチドは、野生型のヌクレオチドに置換される。

【０２９３】

１０Ｘ　10^6ｃｐｍの正常標識プローブおよび変異標識プローブは、別個に各フィルターと混合される。その後、このニトロセルロースフィルターは、ハイブリダイゼーション産物を形成させるために、４２℃にて一晩維持される。上記正常プローブに曝されたニトロセルロースフィルターは、４６℃にて、０．１％のＳＤＳを含む６Ｘ　ＳＳＣによって洗浄されるが、上記変異プローブに曝されたフィルターは、５２℃の、よりストリンジェントな温度にて、同じ溶液によって洗浄される。その後、このニトロセルロースフィルターは乾燥され、そしてラジオオートグラフィーに供される。

【０２９４】

上記点変異を有するこれらの産物のみが、上記変異プローブとハイブリダイズする。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールは、ＰＣＲ増幅が成功したか否かを

決定するために各アッセイ中に含まれる。したがって、実施例１で調製された親のゲノムＤＮＡが、上記示された位置において野生型ヌクレオチドに対して置換された非野生型ヌクレオチドの固有の点変異を有することが、このアプローチによって決定される。

【０２９５】

（実施例５）

（標的ＲＮＡのアンチセンス阻害）

（Ａ．トランスフェクションのためのオリゴヌクレオチドの調製）

リピトイド（ｌｉｐｉｔｏｉｄ）またはコレステロイド（ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｉｄ）のいずれかを含むキャリア分子は、トランスフェクションのために、水中に０．５ｍＭになるまで希釈され、その後、均一な溶液を生成するために超音波処理され、そして０．４５μｍのＰＶＤＦ膜を通して濾過されることによって調製される。その後、このリピトイドまたはコレステロイドは、最終濃度が、オリゴヌクレオチド１μｇあたり約１．５～２ｎｍｏｌリピトイドであるように、適切な量のＯｐｔｉＭＥＭ^{TM}（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ）中に希釈される。

【０２９６】

アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび対照オリゴヌクレオチドは、最初に滅菌したＭｉｌｌｉｐｏｒｅ水中に１００μＭの作業濃度になるまで希釈され、その後、ＯｐｔｉＭＥＭ^{TM}中に２μＭ（約２０ｍｇ／ｍＬ）になるまで希釈される。その後、この希釈されたオリゴヌクレオチドは、直ちに上記希釈されたリピトイドに添加され、そしてピペットで吸引と排出を繰り返すことによって混合される。

【０２９７】

（Ｂ．トランスフェクション）

ＨＣＶ感染に対して感受性であり、かつＨＣＶ複製を支持するヒトＰＨ５ＣＨ８肝細胞が使用される（Ｄａｎｓａｋｏら，Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ．９７：１７－３０，２００３年；Ｉｋｅｄａら，Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ．５６：１５７－１６７，１９９８年；ＮｏｇｕｃｈｉおよびＨｉｒｏｈａｓｈｉ，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ Ａｎｉｍ．３２：１３５－１３７，１９９６年）。混合直後に、この細胞は、上記オリゴヌクレオチド／リピトイド混合物を、オリゴヌクレオチドの最終濃度が３００ｎＭになるまで添加することによってトランスフェクトされる。その後、この細胞は、５％のCO_2、３７℃で一晩、上記トランスフェクション混合物と一緒にインキュベートされ、そしてこのトランスフェクション混合物は、この細胞を３～４日間維持する。

【０２９８】

（Ｃ．全ＲＮＡの抽出および逆転写）

全ＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙ^{TM} ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ）を使用して、この製造業者によって提供されるプロトコルにしたがって、上記トランスフェクトされた細胞から抽出される。抽出の後、このＲＮＡは、ＰＣＲの鋳型として使用するために逆転写される、一般的に、０．２～１μｇの全抽出ＲＮＡは、滅菌したマイクロフュージチューブ中におかれ、そして水が、全量３μＬになるまで添加される。７μＬの緩衝液／酵素混合物は、各チューブに添加される。この緩衝液／酵素混合物は、以下に記載される順序で混合される：

４μＬの２５ｍＭ $MgCl_2$

２μＬの１０Ｘ反応緩衝液

８μＬの２．５ｍＭ ｄＮＴＰｓ

１μＬのＭｕＬＶ逆転写酵素（５０ｕ）（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）

１μＬのＲＮａｓｅインヒビター（２０ｕ）

１μＬのオリゴｄＴ（５０ｐｍｏｌ）。

【０２９９】

上記マイクロフュージチューブの内容物は、ピペットで吸引と排出を繰り返すことによって混合され、そしてこの反応は、４２℃にて１時間インキュベートされる。

【０３００】

（Ｄ．ＰＣＲ増幅および標的配列の定量化）
逆転写の後、標的遺伝子は、Ｒｏｃｈｅ　Ｌｉｇｈｔ　ＣｙｃｌｅｒＴＭリアルタイムＰＣＲ機を使用して増幅される。ＰＣＲ増幅混合物の２０μＬのアリコートは、以下の構成成分を、以下に記載される順序で混合することによって調製される：２μＬの１０ＸＰＣＲ緩衝液ＩＩ（１０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．３）および５０ｍＭのＫＣｌを含む、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ，Ｎｏｒｗａｌｋ，ＣＴ）、３ｍＭの$MgCl_2$、１４０μＭの各ｄＮＴＰ、０．１７５ｐｍｏｌの各ＯＡＳ１オリゴ、１：５０，０００希釈のＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ、０．２５ｍｇ／ｍＬのＢＳＡ、１単位のＴａｑポリメラーゼならびに２０μＬまでのH_2O。ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）は、２本鎖ＤＮＡに結合したときに蛍光を発する色素であり、このことは、各反応において生成されたＰＣＲ産物の量が直接的に測定されることを可能にする。完了した逆転写反応の２μＬは、ＰＣＲ増幅混合物の各２０μＬのアリコートに添加され、そして増幅は、標準的なプロトコルによって行われる。

【０３０１】
（実施例６）
（ＯＡＳ１　RNA_Iを用いる細胞の処理）
アンチセンス処理のために実施例５の方法を使用して、細胞は、上記ＯＡＳ１配列（配列番号１９）に基づくオリゴヌクレオチドを用いて処理される。３’末端におけるデオキシ－ＴＴを有する２つの相補的なリボヌクレオチドモノマーが合成され、そしてアニールされる。上記ＰＨ３ＣＨ８肝細胞株は、１：３のＬ２リピトイドを含む５０～２００ｎＭのＲＮＡｉによって処理される。細胞は、１日目、２日目、３日目および４日目に収集され、そしてＤａｎｓａｋｏら，Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓ．９７：１７－３０，２００３年に記載されるようなウェスタン分析によってＯＡＳ１タンパク質に関して分析される。

【０３０２】
（実施例７）
（Ｃ型肝炎ウイルスのＮＳ５ＡタンパクとのＯＡＳ１相互作用）
本発明のＯＡＳ１タンパク質またはＯＡＳ１ポリペプチドの、Ｃ型肝炎ウイルスのＮＳ５Ａと相互作用する能力は、Ｔａｇｕｃｈｉ，Ｔ．ら，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８５：９５９－９６９，２００４年に記載される方法を使用してアッセイされる。ＯＡＳ１タンパク質およびＯＡＳ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、上記のように調製され、そしてプラスミドは、Ｔａｇｕｃｈｉ，Ｔ．らに記載されるような慣習的な方法を使用して構築される。１つのプラスミドは、ＯＡＳ１タンパク質またはＯＡＳ１ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、そして第２のプラスミドは、ＮＳ５Ａをコードするポリヌクレオチドを含む。このプラスミドはまた、それぞれのタンパク質に対して適切なタグ（例えば、ＦＬＡＧタグ、ＨＡ、またはＧＳＴ）をコードする。適切な細胞（例えば、ＨｅＬａ細胞）は、タグおよびＮＳ５Ａタンパク質をコードするプラスミドならびに異なるタグおよびＯＡＳ１タンパク質またはＯＡＳ１ポリペプチドをコードするプラスミドによって一過性にトランスフェクトされる。インキュベーションおよび（Ｔａｇｕｃｈｉ，Ｔ．ら）に記載されるような上清の調製後、種々の分析技術が、ＯＡＳ１タンパク質またはＯＡＳ１ポリペプとＮＳ５Ａとの結合を、検出および定量するために使用され得る。このような技術は、当該分野において公知であり、これらとしては、共沈分析、免疫蛍光分析、および免疫ブロット分析が挙げられる。ＮＳ５Ａに対する結合を示さないＯＡＳ１タンパク質およびＯＡＳ１ポリヌクレオチドは、Ｃ型肝炎感染のインヒビターとしてのさらなる分析にふさわしい。

【０３０３】
（実施例８）
（ＯＡＳ１の化学的かつ立体的に保存された領域）
当業者が認識するように、酵素活性または治療的可能性を改良するためにＯＡＳ１の構造を修飾する場合、特定の残基または残基の領域は、化学的かつ構造的に保存される必要がある。例として、数種の保存的ドメインが、以下に記載される。当業者が認識するよう

に、このタンパク質の構造および機能を妨害する、いくつかのアミノ酸に対する化学的に保存された変化が許容され得る。例えば、Ａｓｐ７５およびＡｓｐ７７の両方は、ＯＡＳ１機能について本質的である、触媒的な２価の金属イオンを配位する。これらの塩基に対する修飾（例えば、アスパラギンまたはグルタミン酸）が許容され得、これらの残基の本質的に極性の性質および酸の性質は、保存される必要がある。

【０３０４】

例として、配列番号２６～配列番号２９、配列番号３３、配列番号３４、および配列番号５０に関して、以下のポリペプチドフラグメントは、保存的ドメインを示す：

アミノ酸４０～アミノ酸４７：ＦＬＫＥＲＣＦＲ（配列番号７５）

アミノ酸５５～アミノ酸８２：ＶＳＫＶＶＫＧＧＳＳＧＫＧＴＴＬＲＧＲＳＤＡＤＬＶＶＦＬ（配列番号７６）

アミノ酸９４～アミノ酸１１２：ＲＲＧＥＦＩＱＥＩＲＲＱＬＥＡＣＱＲＥ（配列番号７７）

アミノ酸１２８～アミノ酸１３８：ＮＰＲＡＬＳＦＶＬＳＳ（配列番号７８）

アミノ酸１４５～アミノ酸１５８：ＶＥＦＤＶＬＰＡＦＤＡＬＧＱ（配列番号７９）

アミノ酸１８２～アミノ酸１９８：ＫＥＧＥＦＳＴＣＦＴＥＬＱＲＤＦＬ（配列番号８０）

アミノ酸２０１～アミノ酸２１７：ＲＰＴＫＬＫＳＬＩＲＬＶＫＨＷＹＱ（配列番号８１）

アミノ酸２２５～アミノ酸２４１：ＫＬＰＰＱＹＡＬＥＬＬＴＶＹＡＷＥ（配列番号８２）

アミノ酸２９６～アミノ酸３０７：ＰＶＩＬＤＰＡＤＰＴＧＮ（配列番号８３）

アミノ酸３３７～アミノ酸３４３：ＧＳＰＶＳＳＷ（配列番号８４）。

【０３０５】

（実施例９）

（酵素活性部位を改良するアミノ酸の変化）

ＯＡＳアミノ酸配列における変化は、上記タンパク質の酵素活性の改良を想定し得る。１つの好ましい実施形態において、この酵素の活性部位内のアミノ酸は、ＡＴＰまたは金属イオン結合、酵素の有効性、および酵素の進化性を改良するために改変され得る。このような変化の例は、配列番号２６、配列番号２７、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、または配列番号４８のアミノ酸位置６１におけるグリシンに対するチロシンの置換である。化学的に不活性なグリシンから極性のチロシンへの置換は、ＡＴＰのＮ３原子とこのアミノ酸位置との間の水素結合を容易にするはずであり、それによって、この相互作用の解離定数およびエネルギー特性を改良する。チロシンは、例えば、より進化したポリーＡポリメラーゼにおいてこの位置に見出される。当業者が認識するように、他の改変が想定され得る。

【０３０６】

（実施例１０）

（２本鎖ＲＮＡの結合を改良するアミノ酸の変化）

酵素活性を改良する、ＯＡＳに対するアミノ酸改変の第２の例は、このタンパク質と２本鎖ウイルスＲＮＡとの間の相互作用を安定化する改変であり得る。以下の表は、このタンパク質に対してＲＮＡが結合する溝におけるそれらのアミノ酸、および基本的に、正に荷電したアミノ酸側鎖と負に荷電したリボ核酸との間の相互作用を安定化するように設計された数種の変化案を記載する。当業者が認識するように、ＲＮＡが結合する溝に対する同様の型の改変が、想定され得る。

【０３０７】

【表４】

表4

RNAが結合する溝におけるアミノ酸についての変化案

アミノ酸	位置	改変案
グリシン	39	アルギニンまたはリジン
リジン	42	アルギニン
リジン	60	アルギニン
アルギニン	195	リジン
リジン	199	アルギニン
リジン	204	アルギニン

（実施例１１）
（遺伝子変異の分析）
当業者は、多くの他の分析方法が、遺伝子の分析における特定の変異の進化の重要性を評価するために存在することを認識する。１つの例は、一般的にＤ’と称される連鎖不平衡係数の周知の算出である（Ｌｅｗｏｎｔｉｎ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　４９：４９－６７，１９６４年）。他の特に関連する方法は、遺伝子座における、高頻度、中頻度、または低頻度の変異の相対的な量を比較することによって、その遺伝子座内の選択圧および／または最近の進化的事象（例えば、選択的蔓延（ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ　ｓｗｅｅｐ））を推定することを試みる。これらの試験で最もよく知られたものは、Ｔａｊｉｍａ　Ｄ統計量（Ｔａｊｉｍａ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１２３：５８５－５９５，１９８９年）である。ＦｕおよびＬｉ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１３３：６９３－７０９（１９９３）はまた、Ｔａｊｉｍａ統計量および他の統計量に対する変形を開発し、これはまた、各変異に対する祖先の対立遺伝子に関する知識を使用する。これらの方法および他の方法は、上記観察された効果に対する相対的寄与率を評価するために、本発明の変異に適用される。
【０３０８】
特定の実施形態および実施例を含む本明細書は、本発明の例示であることが意図され、そして限定として解釈されるべきではない。多くの他の変更および改変は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく達成され得る。引用された全ての特許、特許公開物、および非特許刊行物は、本明細書中に参考として援用される。

【図１－１】

FIGURE 1

配列番号1
対立遺伝子の改変体:C/T
Genbankゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2135728-2135728
NCBI dbSNP ID (存在する場合):7955146

CCCTCAGAGTGACTGAAGGAAATTCAGAGAAGAGCTGACACCTAAGTTGTAG
ATTTTGCCYGAACAGGTCAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAAT
CTATGTCAAGCTCATCG

配列番号2
対立遺伝子の改変体:G/A
Genbankゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2135749-2135749
NCBI dbSNP ID (存在する場合):3741981

ATTCAGAGAAGAGCTGACACCTAAGTTGTAGATTTTGCCYGAACAGGTCAGT
TGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAATCTATGTCAAGCTCATCGAGGA
GTGCACCGACCTGCAGA

配列番号3
対立遺伝子の改変体:G/A
Genbankゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2135978-2135978
NCBI dbSNP ID (存在する場合):無し

ATGTATGGCCCTCCCACCAGGCCTGGTGGGTCCTGTCTCGACTGGGAGCAGA
GGAGGGGTRGGGGGGAGGAGAGAAAGAAGGGAGTGAAGGGAAGAGGAGGGG
GAGTGGTGGAGGGAAATAG

配列番号4
対立遺伝子の改変体:G/A
Genbankゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2144072-2144072
NCBI dbSNP ID (存在する場合):無し

ACTGAATCCAGCTGCAATGCAGGAAGACTCCCTGATGTGATCATGTGTCTCA
CCCTTTCARGCTGAAAGCAACAGTRCAGACGATGAGACCGACGATCCCAGGA
SGTATCAGAAATATGGT

【図１－２】

FIGURE 1

配列番号5
対立遺伝子の改変体:G/A
Genbankゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2144088-2144088
NCBI dbSNP ID (存在する場合):2177979

ATGCAGGAAGACTCCCTGATGTGATCATGTGTCTCACCCTTTCARGCTGAAAG
CAACAGTRCAGACGATGAGACCGACGATCCCAGGASGTATCAGAAATATGGT
TACATTGGAACACATG

配列番号6
対立遺伝子の改変体:G/C
Genbankゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2144116-2144116
NCBI dbSNP ID (存在する場合):1051042

GTGTCTCACCCTTTCARGCTGAAAGCAACAGTRCAGACGATGAGACCGACGA
TCCCAGGASGTATCAGAAATATGGTTACATTGGAACACATGAGTACCCTCATT
TCTCTCATAGACCCAG

配列番号7
対立遺伝子の改変体:G/A
Genbankゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2144321-2144321
NCBI dbSNP ID (存在する場合):2660

GGGCTCCAGTGTTATCTGGACCAGTTCCTTCATKTTCAGGTGGGACTCTTGAT
CCAGAGARGACAAAGCTCCTCAGTGAGCTGGTGTATAATCCAGGACAGAACC
CAGGTCTCCTGACTCC

配列番号57
対立遺伝子の改変体:C/G
Genbankゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2131025-2131025
NCBI dbSNP ID (存在する場合):1015542

TAACGCATGCCTGTAGTCCCAGGTATTCAGGAGGCTGGGGCAGGAGGATC
SCTTGAACCCAGGAAGTTGAGGTTGCACGAGTCATGATCATGCCCCTGCAC

【図１－３】

FIGURE 1

配列番号58
対立遺伝子の改変体:G/A
Genbank ゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2133961-2133961
NCBI dbSNP ID (存在する場合):757398

GACAGGAAGTGTAACCTCTCAGAGGCTCCCTTGCCACATCAGGAGAATTGR
TAAAACCACACTACCTGTATCATATCATTATTTTAAGTGATAAATGATCA

配列番号59
対立遺伝子の改変体:C/A
Genbank ゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2139587-2139587
NCBI dbSNP ID (存在する場合):(不明)

TAGCATTAGGTATATCTCCTAATGCTATCCCTCCCCAATTCCCCCCACCCMGC
TTGTTGGTATTTGTATATCTTCATTTGAGAATTCTCTGTTCATGTCCT

配列番号60
対立遺伝子の改変体:T/G
Genbank ゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2144294-2144294
NCBI dbSNP ID (存在する場合):(不明)

GTGCATCTTGGGGGAAAGGGCTCCAGTGTTATCTGGACCAGTTCCTTCATK
TTCAGGTGGGACTCTTGATCCAGAGARGACAAAGCTCCTCAGTGAGCTGG

配列番号61
対立遺伝子の改変体:A/G
Genbank ゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2144985-2144985
NCBI dbSNP ID (存在する場合):7135577

GAAAAATTATAGAACCTCCCTGTGTGACACAGCAGCCACTAGCCACATGTR
TCAAATGCTTAAAATGTAGCTAGTCTAAATCTACATGTGCTGTGAGTGCA

配列番号62
対立遺伝子の改変体:C/T
Genbank ゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 (開始一終止):2156523-2156523
NCBI dbSNP ID (存在する場合):7968145

ATGCTTCTATAGGCTTTTCTCACTGATGCTCTCTGGGCAGACAGGCTCCTY
AATATGAGAGTGACACACACTCCTTTCTTCATTTTCAGGTAAACCTCACA

【図１－４】

FIGURE 1

配列番号63
対立遺伝子の改変体:A/-(AまたはAの欠失)
Genbank ゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 :2156595-2156595
NCBI dbSNP ID (存在する場合):(不明)

CCTTTCTTCATTTTCAGGTAAACCTCACACTGGTTGGCAGAAGGAACTAT(A-)
CCAATAATTAGTGAACATGCGGTGAATTTGCAACAGACAAGASGAGCCTC

配列番号64
対立遺伝子の改変体:G/C
Genbank ゲノム配列番号:NT_009775.13
ゲノム配列上の変異の座標 :2156638-2156638
NCBI dbSNP ID (存在する場合):7967461

GAACTAT(A-)CCAATAATTAGTGAACATGCGGTGAATTTGCAACAGACAAGAS
GAGCCTCATTATCCTATAGTTTCCAGGTTGCTTAGGGAGGCAGAAATCAC

太字の一重下線の塩基は、それぞれの配列番号によって同定される特定の対立遺伝子の改変体を示す。配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号60、配列番号63および配列番号64中の二重下線の塩基は、別の与えられた配列によって同定される定義配列中の重複変異を示す。例として、配列番号1および配列番号2ついて与えられた定義配列は、このゲノム配列内で重複し、従って、それらの配列は、配列番号1および配列番号2によって同定される両方の変異を、それぞれ含む。

配列番号63において、変異は、(A-)で表示されるように示される位置において交代性に、AまたはAの欠失である状態である。

変化する核酸は、以下:
R=A/G
Y=C/T
S=C/G
K=G/T
M=A/C
W=A/T
をコードする。

【図２－１】

FIGURE 2

NCBI登録番号 NT_009775.13 の 2,130,000 ～ 2,157,999 の配列フラグメント

```
2130000 GGCTGCAGTGAGCTAAGATTGTGCCACTGCACCCCAGCCTGGGCAACAGAGTGAGACCCT
2130060 GTCTCAACAAAATAAATAAATATATTTTGAATTAAATTAAAATGAAAAAACAGCCTATCA
2130120 AAAAGTGTGGGATGTAGTGAAAGTAGTGTTTAGAGGGAAAGTTATAGCATTGAATGCATA
2130180 TATTAGGAGAAGAAAGATCTAACTCAGAGAGGGATGAACAGGTGAGGCATAGGGGATTTT
2130240 AAGGTAGTGAAACTCTTGCAGGGCAGGGGAGCCCCAAAACTGGGACACCGTCCGGGAAGG
2130300 CTCTTGGCTTCGTCCAGGAAGGAATTCAAGGGTGAGCTAGAGGAGGAAGAAAAAGTTTA
2130360 TTGAGGCAGCAGGGTTACAGTTCTGTGACTGTCCCTGCAGAGCACGGGCCACCCCATAGGC
2130420 AGTGCCTGGAGAGCAGCAGCTCAGGGCACTTCTATAGTCATTGATACCTCACTTTAAA
2130480 TACGTGCAAATTTAAGGGCAGGTTATTCAGAAATTTCTAGAAGAAGGGTGGTAACTGGGTC
2130540 ATTGCCAGGGAATGAGTAAACTGTTCATGGTGCTGGTGCTCATGCCAGCCAGGTCTTCAAT
2130600 CTGGCCCTGAGTCAAGCCCCACCTCCTATCTCAAAACTATTCTGCATGGTGCTGTAATGG
2130660 TGGATACATGACATGTTATGTTTGGCAAAATCCATAGAACTGTAGGACACAAGAGTGAAC
2130720 CTTAATGTAAACCTTAATGTAAATGGACTTTTGTTAATTATGATGTATTAATATCAATTC
2130780 ATCAATTGTAACAAATGTATCACAGTACTGTTAATAATAGAGAACTTTATTGGCAGGAGA
2130840 GAGAGCTTATGGAACTCTCTGCACATTCAGCTCAATTATTTCTGTAAGCCTAAAACTGCTG
2130900 TGAGAAATAAAATCCAACCTGGGCAACATAGCAAGACCTTGTCTCTACAAAAAATAAAAA
2130960 ATGAGCTGGGTGCAGTAACGCATGCCTGTAGTCCCAGGTATTCAGGAGGCTGGGGCAGGA
2131020 GGATCCCTTGAACCCAGGAAGTTGAGGTTGCACGAGTCATGATCATGCCCCTGCACTCCA
2131080 GCCTGGATAACAAGCAAGATCCTGTCTCCAAAAAATAATAAAATAAAATAAAAATCTAC
2131140 TAATTGAAAGGGAAAAAAGCATAGTATAATACCATTCTTAACAAAAAGAAAAGAGACCTG
2131200 TGTTTGTGTGTGTGTTAACATTTGAAAAAAATCTGGAAAGCTCTATATCAAAACGTTTAT
2131260 AGAGGCAATTTTGTAGTGTTAGAATCATAGATGACTTTCCACTTCCTGGTTTTTCTGAC
2131320 TTTTTTTCTTTTTGCAGTGGGCATGTATTGCTGAAAATACCACAGACAACTGTGAAAGG
2131380 ATTTCATCAACAACAAAAAAAAGATAAAGAAGAAACACAAAATCTGTTAAATAAGATTT
2131440 ATGTTGGCTGGAGGTTAAAATGCATTTCCAGAGCAGAGTTCAGAGAAGCTGGGCTGCT
2131500 TGTTGCTGGCTAAAGGACAAGGGTNAGTTTCTAGGAAGCAGAAGAGTGAGCAGATGAAAT
2131560 TCAGCACTGGGATCAGGGAGTGTCTGATTTGCAAAAGAAAGTGCAAAAGACAGCTCCTC
2131620 CCTTCTTAGGAAACGAAACCAACAGCAGTCCAAGCTCAGTCAGCAGAAGAGATAAAAGCA
2131680 AACAGGTCTGGGAGGCAGTTCTGTTGCCACCTCTCCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAA
2131740 ATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTTCATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTT
2131800 TCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTTGGTTCCTGAAGGAAAGGTGCT
2131860 TCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGTGAGTCCAGGCCTGC
2131920 CTGGCCAGGGGAGGGGTGGCTGAATGTGCAAGAGTTGAGAATCGAGAAGACGAGGA
2131980 GAGAGAGAAGCAAAAACCTAGAACCCAGGGTGCAAATGTGAGTACAGAGAGCTGAGATCT
2132040 TCTGGGATGGTGGTTCTTCTATTTATCCACACAGCATGTTAAAATAGATTCTGGGGTGAAA
2132100 TCCTACATCCCTATTATTAACAAGTGACCCTCCCCCCTACTTCCCGCTGAAGTTTATGAA
2132160 CCACTGTCCTGGGCGATGCCATTTCAGAAATAGGGAACTGAATCCCAGCTCTGGTAAAC
2132220 AGTTTGCTAATTCGTGGCCAGGCTAGGGGCTCACCATTTCTGCAGTGAAGAATCATAYGT
2132280 TTTGAAAGCAAATAGCACCTGCTGGCTGCAAGACCTTGAGCAAGTCACTTAACTACTCTG
2132340 TGTTCCAATTTCCTCAGCCATAATCCCCAATACTGTTGCAGTCTTGCCAGTGCACCTTA
2132400 TGTAGCAGCTTCTCACTGAATAGTATCCCAAGGTCTTTGTCCTCGCATCCAAGAAATTA
2132460 AGGAACATGGACACAAACGTGAGCTTGGAGCAAAGTTCAGTAAGAAGAAGAAGCT
2132520 GTCTCCACTGTGGAGAGGGAACTCTGAGTGGATTGCCAGATTGCAGCTGAATGCAAAAAA
2132580 CTTTTATAAGAACACCACTCTCCCCTGTAACTGTTTGAGAAACTTTTTATCAGTAAAGC
2132640 TGTTCTACTTCCCTTACCTTATGCAGCTGTGGGTATATCTCTAGGCAAGCATAAAGCGCT
2132700 GCTTCTCTTGTAGTGTATAACTGTGGATTTGTTTTAGGTAAGTCCCACTCCCTGCGCCAGT
2132760 TTCAGGCAGCCCGCTCCTCCAGGGCCCAGCCTTGACCATTTACCTAACTGATTTTTCCTC
2132820 TACTTTCCCTCAATACCTCATAGGGCCGTGTAGATTAAGTAAGTGTGAACCA
2132880 CCCAGCATAAGCTAGTCCTGGGCATCGTAAAGGACAATGGGAAAAGAACACAGATCCTGG
2132940 AAGAAGGCCCCCAGGTTTGAATTGTATTTGCCACCTACTAGCTGGGTGATGGGCTGATA
2133000 TATTATCTCACTGAGCATCCATTTTCCCATCTGTAAAATGGGAACTAATGATAATGGCAT
2133060 CCAAATCATAGCATCATTGTGAGCATTATAGGAGTTACATGCAATGCCTTCAGAAC
2133120 AGTGGCTAGTGCTCCATAATGTTAGTGATTGCTCCTGTCATTTTATTTAGGGAGGTTTGC
2133180 CTCACTAAGCATCAATTATTATTTTTGTCGTCTTTTCAGGGTGGCTCCTCAGGCAAGGG
2133240 CACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCCTCACCAC
```

【図２－２】

FIGURE 2

```
2133300 TTTTCAGGATCAGTTAAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGA
2133360 AGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCATTTTCCGTGAAGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGG
2133420 CAACCCCGTGCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAGGGGTGGAGTT
2133480 CGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTGAGAGCTCCCCAGCTTCTTTTTCTCCCTCT
2133540 TCCCATTTCTGAGCAGAAATCTCCCACAGTTTGAGAGCTTTTGCCCCAACAGGCCATCT
2133600 CTCTAAAGCAGGGTGGGAGGAGATCTTAGGATCTGTCCCGGGGCAAGAATGAATACGGTC
2133660 ATGATCTATCACAGGAGAGAGACATTAAACAGCAAATTGGCATAATGTGGGGACAAAGACAT
2133720 TTCTTACAGAACATCTGCAAGGCTTACTGGTTCTGTTTAAGGCAAAATGTGTGAATTTTA
2133780 TCTTTCTCAAAATCAGGCAGCAAAGATGTGGCTTAAAGTTCATGTTACTCTCATCTTTGTC
2133840 CCAACATGAGATCTCATCAAACGTATGCAGCACGTTGGGAGATAGATATTTATAATTTGC
2133900 AGGAACATTTGGACAGGAAGTGTGAACCTCTCAGAGGCTCCCTTGCCACATCAGAGAATT
2133960 GGTAAAACCACACTACCTGTATCATATTATTTAAGTGATCAATGATCATCTACATT
2134020 CAGCTCTGATGAGTAATAGGTGTTCAAAAATAGGAACTTCCAGCCAAGTGTGCTTGCTCA
2134080 TGCTTGTAATTCCAACACTTTTGGAGGCTGAGGCAGAGGGTCGCTGAGCCCAGGAGTT
2134140 CAAGACCAGCCTGGGCAGCAAAGTGAAACCTCATCTCTACTAAAAATTTTAAAACATTAG
2134200 CCAAGTGTGGTAGTACATGCCTGTGGTCGCAGCTATTCAGGAGCTGAGACATGAACGATC
2134260 ACATGAGGCCAGCCAAGGATTCGAGGTGTCAGTGAGCCACGAATGTACCACTGCACTCCA
2134320 TCCTAGGCACAGAGCAAGAGCAAGACCCTGTCTCAATCAATCAGTCAATCAGTCAAAACT
2134380 ATGAATTTCCCAGCTGTATATGAAGGCACCTCAAAACACCACAGTGAACTCACAGAGGGA
2134440 CACGGAATAGTTTAGATTTTAATTTTTTGAGGGAAATGCGATGACATCGTCACACACCG
2134500 CACAAACGGCTACTATTAAACTGAACTTACTGATTAGTGGCTACTAATTAATAGTTGGTC
2134560 ATTAAGCAGTAATTAGTGATTAATTATCAAGTAATTAGGACTTATTAAAGGAAAAGAACG
2134620 CAGTTTCCTTTAGTCCTAGGGCAGCCATGAAAAAAAAAAATGCTGACTCTCCAAAGACACC
2134680 AGGGTATGAGAAAGTTTTGGATTCTCCTTTGTCCATCCTGTGTTGGGGGCTGAAG
2134740 TACAATGGTTGTAAAAGACAAGAGGGAGAAGGCTGGTCACAGTGGCTCACGCCTGTAATC
2134800 TCAGCACTTTGGGAGGCCAAAGTGGGGGGATCACTTGAAGTCAGGAATTCAAGACCAGCC
2134860 TGGCCAACATGGTGAAATCTCACATCTACTAAAAATACAAAAATTAGCTGGGCGTGGTGG
2134920 TGTGTGCCTGTAATCACAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCAGG
2134980 AGATGGAGTTGCAATGAGCCAAGATCATGCCATTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGTG
2135040 AGACTCCATCTCGAAAAAAAGAAAAAAGAAAGAATAATAGCAGTATTAAAAAAGAAAA
2135100 GAAAAGAAAACTAATGAGGGTGAAACAATAGATAGCCATGGGGGTTAGGAGCTTTTCA
2135160 GACAGGGTCGTGAGGGAGGGTCCCTGAGCCTGAGTGGCGAGAAGGAGTGAGCCTTGGGGA
2135220 GATCTGGAGGTTCTGGGAAGAGGAATGGCAAGTGCAGAGGCCTGAAGCAGCAATGACCA
2135280 TGGCACATTTGAGGAAGAGAGAAAAAGTCAGAGAAGTAGAAAGTGGGCAAAGAAGCAAG
2135340 ACAGGAGGTGAGGTGGGAGAGGTTCCAGAGACCAGATCACACCAGACATCATTGGCCACCC
2135400 ATAAGATCTTTGGGTTTTAAAATTCCAGATGTTATGGGATGCAGGAAGCAGCATGATCAG
2135460 CAGCATTCTCTAGGTGCCAGGTTGAGAACAGGCTGTAAAGAGGTTGGGGGAGCTGATAAGAGGTTGCT
2135520 GCCATAGTTCCGGCGAGTGACGGTGGTGGCTTGGATGGGGTGATGGCAGTGGAGAGGGCA
2135580 GGAGGGAGGATCAGGAATGGACCTCAAGACTTCCCAGCCCTGGGTCTGCTCACTTTTCA
2135640 ATCAAACCCCATGGCCAGGGAGATTGTCCCCTCAGAGTGACTGAAGGAAATTCAGAGAAG
2135700 AGCTGACACCTAAGTTGTAGATTTTGCCGAACAGGTCAGTTGACTGGCGGTCTATAACCC
2135760 TAACCCCCAAATCTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGAGGGCGA
2135820 GTTCTCCACCTGCTTCACAGAACTACAGAGGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCCACCAAGCT
2135880 CAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATGTATGGCCCTCCCACCAGGC
2135940 CTGGTGGGTCCTGTCTCGACTGGGAGCAGAGGAGGGGTGGGGGGAGGAAGAAGGG
2136000 AGTGAAGGGAAGAGGAGGGGAGTGGTGGAGGGAAATAGAGGGATGAAAAAGGAGAGAA
2136060 AGGAAAAGAGGTGGAGAAGAGGAGCCTGCAACAGAAGGAGAATGAAGGGAAGGAAGAG
2136120 AGAAGGAAGGGATTTGGTGTTCTGTCCCAGAACTTAAACAGAGC
2136180 CTGGTGCATAATAGGTTAGGTAATTACTGTTGAATAAATGAATCAATGCTACAATCACACAC
2136240 GCAGCACACACACACAGAGAGAGGTCAACCACACTCTTCAGAAGGTGGATAGTTAAA
2136300 ACAAGAGTTTCAAACAANNTATGTTCAGATGCCCTTTCCTCCCACTTACTGGCTGGCTG
2136360 GCCTTAAGTAAGCAACTTAACCTTTCTGTTCTTTCTGTACTGCAACGAGTAGC
2136420 ATGCCATAGCTAGAGTAACACGGCATATAGTTGGTCCCTGATAAATGTAGCATATTTTAGC
2136480 CACCATAGGAGTACACATAATAAAAGCTAACATGTAGTATGTGCTTAGCTTATCTGTTT
2136540 TTGTGGATGTGATACAATTTTCTGTTCACTTTTAAATGCCCTGCATCTTAGTCAATTTTA
2136600 ACAGTGATTCTGTAAGTTAGATAAGGTTAGGCATTATTAATTCAATTTCACACCAAG
2136660 AGAAACTTGGGTCAAAAAGAGAAACTCCTGGGTCACATGGCTCATTCGGCCAATAAGTAG
```

【図２－３】

FIGURE 2

```
2136720 CAGAAGTAAAATTTGAATTTGGCTGGGCGCGGTAGCTCACACCAGTAATCCCAGCACTTT
2136780 GGGAAGCCAAGGCAGGTAGATTGCTTGAGCCCAGGAGTTCAAGACTAGCCTGAGCAACAT
2136840 GGCAAAACCTCGTCTCTACAAAATAAACTAAAAATTTAGCCAGGTGTGATGGTGAGCACC
2136900 TGTAGCCCCAGCTACTGGGTAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCTGGGAGGAGGAG
2136960 GTTGCAGTAAGTCAGGATTGCACTACTGCCCTCCAGCCTGTGAGACAGAGCAAGATCTTC
2137020 TCTCAAACAAACAAACAAACAAACAAACAAAACTCGAATTTGGGTCTATTGACTTAAGA
2137080 GTTTGCCTGATAATAATAGGCATTCAATGTATATTTCTTGAATGAACGAATGAATGAAAA
2137140 TAATCAGGAATAAACTTCCAATTTAAAAGTAACACCTCTAGGTAAAAAAAAGACAATCA
2137200 TTTAGTTGCCAGACTTCTAAGTGTTTGCTGTTCTATGAATTGTAATCATGGAGCCTGAGC
2137260 ATTGTAGAATTTACAAAAGCAGTTCCTGACAAAAGCAGCACTGCCCCCAGGGACATATTG
2137320 AAAATTAATGAGGGTGTTTTTGGTAACCATGGTGATGGGAGGACATGGGTGCTACTTATA
2137380 TTTAGTGGAAAGAAGACAAGAATGCTAGTTATTGACAATGATCAGAGAGTCCTGCACA
2137440 GCCAAGAATTGTCTTTTCCTTCTTTCTTGATGCTGTTCTCCTTTAAAACAAGACAAGAT
2137500 TAACAATAATTTAACTCCACTTAACCACCATCATCACCACCTCCAACTTATATGCTACATT
2137560 TCTTGTATATTTCAAGTCGTTTATATTTCAAGTGCCTGAAGTATTATTGTTTTATAG
2137620 CCAAATGTTTAGTTAATCTGCTCACAGATTTACCACTTTCTTCACTATTCATTCGTCCTT
2137680 ACACCTCTAACAATTCCATCTGGGGTAATTTTCCTAAATGATCATGCATCCTTTGGGATTT
2137740 CTTTTGATGATGGTCTATTGGTAGTAAACTCTCTCAGTTATTGTTTGTCTGAAAAGTGCA
2137800 TGCTTTGCCTTCATTGTTGAAGGGTGCTTTTGCTGGGTTGGTCATTTCAGTAATTGAAT
2137860 ATATCATTCCATCTTCCAGTGTCATCATTAAAAAGTCAGTTGCCAGTCTAACTGCAGCTC
2137920 TTTTATAAGTAACCTGTCTTATTCTTCTGGCTGCATGTAAAAGTTTTCTCTTTGTCTTTG
2137980 ATTTTGTTTAGCTTCAATCTGCTGTGTCTTAATGATGGGTTCCTATTGTTTGTCCTGATT
2138040 GGGATTCCGTTAAGATTCCTGAATCTGTGGGTAGATATCTTTAATCAGTTTGAAACTTC
2138100 TCAGCCATTCTTCTAAAATATTGATTCTCCTTCATTCTCTCCTCACCTTCTAGAATTCCA
2138160 ATTAAATGTATGTTAGACCCTGCTCTATCTTTCATTCTCTCCTCACCTTCTAGAATTCCA
2138220 TCATCCTTTTGTCTATTTTTCCATGCTTTATTCTGAATAGTTCCTTCTAAATCTACCTTCC
2138280 AATTAACTAATTTTCTCTTTAGCTATATCTAATTTGCTGTAATTAATTACAGTTGCCATT
2138340 TTTATCCTAAAATTTCTATTTCATATTTTTGTATCTGCCATGGTACTTCTTATGGCTTTT
2138400 AATTCCCTGCTAACTATTTAAAGTTCTTATTTCATCCTGTGAATATGATATTCCTAGTTA
2138460 TTTTATTTTTAATTTTTATTATTTGTTAATCTTATGTTTTATTTACACTTCTTTTCTGTG
2138520 ACATGAGCACACACAGATTCATGTGTATACATATATGGCTCTGATACCTCTCTTCCTG
2138580 TCCTCATTCAAACCACTGATCACAGAGAGAGGACTATTTTTTTTTATTTTTAATTTTTCT
2138640 ATTTCAATAGGTTTTGGGGGACAGGTGGTTTGGTTACATGAATAAGTCTTTTAGTG
2138700 GTGATTTTGGTGCACCCGNCACCAAACAGTGTACATTGTACCCAATCTGTAACTTTAG
2138760 ACCCTTGCCACACCCCCACCCTTCCCCGCAGTCCGCAAGTCCCAGTATCATTCTTATG
2138820 CCTTTGCTCTCCTCATAGCTTAGCTCCCACATAGGAAGTCCCAGTATCCATTCTTATG
2138880 CCATTCCTGAGTTATTTAATTAAAATAATAGTATCCAATTCCATCCAGGTTGCTGTGAAT
2138940 GCCATTATTTTGTTCCTTTTTATGGTTGAGTAGTATTCCATGGTGTATTGTGTGGTAT
2139000 AACATTTTTCTTTATCCACTCATTGATTGATGGGCATTTGGGCTGGTTCCATATTTTTGC
2139060 AATTGCAAATTGTGCTGTTATAAACATGTGTTGTGCAAGTATCTTTTTTGTATAATGACTT
2139120 CTTTTCCTCTGGGTAGATACCTAGTAGTGGGATTGCTGGATCAAATGGTAGATCTACTTT
2139180 TAGTTCTATAAGGAATCTCCACACTGTTTTCCATAGTGGTTGTATGAGTTTACATTCCCA
2139240 CCAATGGTGTAAAAGTGTCCCTTTTCACCACATCCACACCAACATCTATTATTGTTTGA
2139300 TTTTTTATTATGACCATTCTTGCAGGAGTGAGGTGGTATCACATTGTGGTTTTGATTTGC
2139360 ATTTCCCTGATAATTAGGGATGTTGAGCATTTTTCCATTATGCTTGTTGGTATTTGTTTTT
2139420 TTTTTTTTTTTTTCATTATTATACTTTAAGTTTTGAGTGTCACAATGTGCAGGT
2139480 TAGTTACATATGTATACATGTGCCATGCTGGTGTGCTGCACCCATTAACCCGTCATTTAG
2139540 CATTAGGTATATCTCCTAATGCTATCCCTCCCCAATTCCCCCCACTTTTTGATGAGATT
2139600 TTGTATATCTTCATTTGAGAATTCTCTGTTCATGTCCTTAGCCCACTTTTTGATGAGATT
2139660 TTTTTTTTCTTGCTGATTCGTTTGAGTTCTTTGTAGATTCTGGATATTAGTTTGGATGTAT
2139720 AGATTGTGAAGATTTTCTCCCATTCTGTGGGTTGTCAGTTAACTCTGCCTAATTATTCTTT
2139780 TTGCTTTGCAGAAGCTTTTTAGTTTAATAAGTCCCACTATTATCTTGTTTTTGTTG
2139840 CACTTGCTTTTGGGTTCTTGGTCATGAAGCTTTGCCTAAGCCAATGTGTAGGAGGGTTT
2139900 TTCCAATAATCATCTTCTAGAATCTTTATGGTTTCAGGTCTTAGATTTAAGTATTTGATCG
2139960 ATTTTGAGTTGAATTTTTGTATAAGGGGAGAGAAGATTCAGTTTCAATTCTTCTACAATG
2140020 CAACTTGCCAATTATCCTAGGACCATTTGTTGAATAGGGTGTCCTTTCCCCATTTTATGT
2140080 TTTTGTTTGGTTTGTCAAAGATCAGTTGGCTGTAAGTGTTTGGCTTTATTTCTGGGTTAT
```

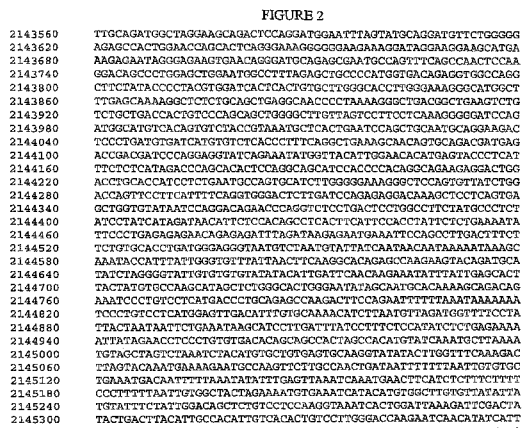
【図２－４】

FIGURE 2

```
2140140 CTATTCTGTTCCATTTGTCTACGTGACTATTTTTATACCAGTACCATGTTGTTTTGGTGA
2140200 CTATGGCCTTACAGTATAGTTTGAAGTCTGATAATGTAGAATGCCCATCAGATTGTTCTTTT
2140260 TACTTAGTCTTGCTTTGGCTATGTGAGCCTCTTTTTTGGTGCCATATGAATTTTAGGATTG
2140320 TTTTTTCTAGTTCTGTGAAGAATGATGGTGGTATTTTGATGGGAATTGCATTGAATTTGT
2140380 AGATTGTTTTTGGGAGTATGGTCATTTTCACAATATTGATTCTACCCATTCATGAGCATG
2140440 GGATGTGTTTCCATTTGTTTGTGTCATCTATGATTTTCTTTCAGCAATTGTTTATGTTT
2140500 TCCTTGTAGAGTTCCTAGTTATTTTAAAGTCTGTGTTCGGTCTTTCAGCATTTAAAGTTT
2140560 GTAGGTTTATTACTATTTCTCTTTCTGTTGGTCATTAACTGTTAGTGTTTTGTTTCCT
2140620 TGTGTGCCTGGTTACATATGTGCTGGTCATTGTATTTGAAAATTATGTGTGAAATAATTT
2140680 GAGGTTTGGATTATGTATATTCCTCCAGAAAGAATTTCATTTGCTTCTGTTGCATTTCTT
2140740 AGGAACATTACAAGTCCTTCTTCTCAGTTAATTTTCGTAGTATCTTTATCAGATAGGTGC
2140800 TATTACAACCACTCACTTAGCAGATGAAAATCATGAGGCTCTGAGAGTCTAAGTCATCTA
2140860 CTTAGATTGGACAATGGTGAAGCCAGGATTCAAACCCACATCAATAAGAATCCCAGCCT
2140920 CTTAACAAGGGGCCAGTACACTTTTTTAAAAAATAAAAGGCTAGATAGTAAAATATTTAG
2140980 ACTTTGTGGACTGCACAGCCTCTGTTGCAACTACTCAACCCTGCCTTTGTAGCATGAATG
2141040 CAGTCATAAACTATACATAAATGAATGAGCCTGGATTCGTTCCAAGGAAACTTTATAAAA
2141100 ACAGGTGGCAGGCTGGATTTGGCCCATGAGGGTAGTTAGTTTACACAAAAGTTGAGCAAAC
2141160 CAATTTTTTTCTGATTGTTTTCCTCTTCTCAGTGTAAGAAGAAGCTTGGGAAGCTGCCA
2141220 CCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACAGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGAGCATGAAAACA
2141280 CATTTCAACACAGCCCAGGGATTTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAA
2141340 CTCTGCATCTACTGGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCTATTGAAAAGTACCTG
2141400 AGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGTATGCTATCCCCACATGGCTTAGCTCCCCTATGTAA
2141460 ATGAACACCTGGATACAGGTACAGTGCCTTGGAAATGGAGGAGTGGCGAGGCTCCCCAC
2141520 TTAGTGAGAATCTCCTGTTGCCCATCATTGTACTGGGCATTTTACTACTGCCATCTGTTT
2141580 TAAACACCTACCTCCAACCCTGTGAGCCAGGCACTATGCCAATTATTTACAGGTGAGTA
2141640 AACTGAGGTTCTGAGAGGTAAGGAGCTTGTCCAACCCTAACAGAAAATGAGTAAAATAG
2141700 CTGCAGTTTGAACTGAAATAAGAACAGCAGCAACAACATGATAGTAATTGCTCCCAGGT
2141760 ATTGAAAGCTGTTGTAAGACTAACACATGCTAATATAATAGTAAAAATTATTAGCAATA
2141820 TTACTGATATGTAGTTATGTTTCAGTCGCTGTGCTGAGCATTTCATCACACACACAC
2141880 TTCTATCCTCACAGCATAGCCTTTGAGAATGAGTATGTGGAACTATTCCCATTTACAGAT
2141940 AAGAATCCTGAGGCTTAGAGAGTTCAAGTGACCTACCCAAGGGCACATCACTGATAAAGG
2142000 GCAGAGGTGGGAPTCAAACCCACATCTGTCAGGTGCAAGTCCAAGGCTCTTCTCCTCAT
2142060 GCTCACTGCCTGCTGGGGAATAGGGCACTGGGGACATACCCCAGGGAGCCCTTCCTCATG
2142120 TTCTGAGTCCCAGTTCATCCCATGCTGCTATTTTGCTCTCCAGGAGCATCTGATTTCCT
2142180 TAGACAGAGCCCCAGCTTCTCACCTGTCCCTCTCTAAATGCTGCTCTGCAGGCCTGTGAT
2142240 CCTGGACCCGGCCGGCAACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCA
2142300 GCTGGCACAAGAGGCTGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTC
2142360 CCCAGTGAGTCTCCTGGATTCTGCTGGTGAGACCTCCCTGCTTCCTCTGCCATCATCCC
2142420 TGCCCCTCTCCATGAAGCTTGAGACATATAGCTGGAGACCATTCTTTCCAAAGAACTTAC
2142480 CTCTTGCCAAAGGCCATTTATATTCATATAGGTGAGCCATGTGCTCCATATTTTACAGTC
2142540 ATTTTGGTCACAATCGAGGGTTTCTGGAATTTTCACATCCCTTGTCCAGAATTCATTCCC
2142600 CTAAGAGTAATAATAAATAATCTCTAACACCATTTATTGAGCTTCGGTCTAGG
2142660 TTCTGTCCTAAGCCCTTAATATGCACTCTCTCATTAAATAGTCACAACAATCCCATGAG
2142720 GCATTTTTAAAAATTTTTATTATTTTGAGATTCAGAGGGCGACATGTGCCATTTGTTACAC
2142780 AGCTATATTGTGTAATGGTGGGGTTTGGGCCTCTAATGACCCTGTCGCCCAATAGTGAA
2142840 CAGAGTACCCAAAAGAATTTTTTCAACCTTTGCCTTTCTCCCCTTCCTCCCCCTGTTGG
2142900 AGTCCCTAGTGTCTATTGTTCCCATCTTTAGCAGATGTTAAGTATTTGATTTCTGTTC
2142960 TGGGTTAATTCACTTCGGATAATGGCCTCCAGCTGCAACCATGATTTCATTCTTTCCTTAT
2143020 GGCTGCATAATACTCCCATGGTGTAGATATACCACACTTTCTTTATCCAGTTCACACTGAT
2143080 GGGCACTTAAGTTGATTCCATGACTTTGCTATTGTGAATCGTACTGCGATAAACATACGA
2143140 GTGCCGGTGTCTTTTGATAGAATGATTTCTTTACCTTTGGGTAGATACCGAGTAGTGGGA
2143200 TTGCTGGGTTGAATGGACATTCTACTTTTAGTTATTTGAAAAGTCCCATGAGGCATGTTT
2143260 TCTATCATTCCATCTTACAGATGAGACAAAGGCTCAGAGAGGTGAGGTCACTTGCTCAA
2143320 GGACATCAGCTAACAAGTGGTGGAAATGGAATTCAAGCTCAGTGGACTCTAAAGCCAGTG
2143380 CTCATGTCACTGTGCTAAACAGCCTGCCTTGTCACATCCCCCACCTCTCATCTGACCAATG
2143440 GGAGACTCTGAGCAGCTGAGTGACTTGGGTTGTCACACAGCTAAACAGGGGCAAAGGACC
2143500 CAGTCTTGGATCTTTCCACCTCCAAGCAGGAATCTGTCTGATTCCAGGGGATTCATGATG
```

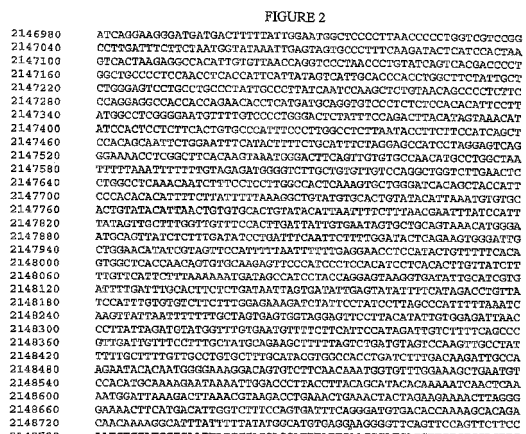
【図２－５】

FIGURE 2



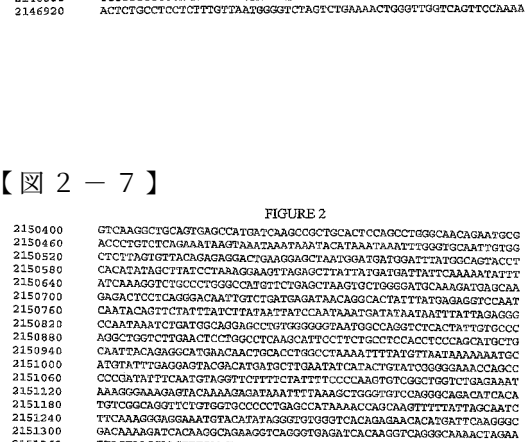
【図２－６】

FIGURE 2



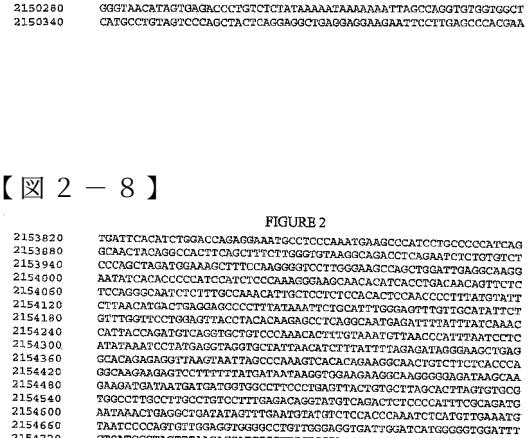
【図２－７】

FIGURE 2



【図２－８】

FIGURE 2



【図２－９】

FIGURE 2

```
2157240  GCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGTGAGACTACATCTCAAAAAAACAAAAACAAACAAGCA
2157300  AAAAAAACCCCACAGTAACACAAAAGTAATAAAACTGCTGCTATTTACTCAGTGCTTATC
2157360  TGATGCCAGCCACTTTGCTAAGCCTATGAATGCATTATTTCCCCGTTGCTACAGATGAGA
2157420  GAATTGAGGTTCAGACAGGTTGAAATCATTGCTCCCAAAGTCACACAACTGGTGAGTGGC
2157480  AGAGCTGGGATGCAAACCCTAAACTGCCAGCCCTCAAAGCCTGTGCTCTTAATCTCCACC
2157540  CTGCTGTGCTTCCTTGTCCATTTAATTAAGCTCCACAGGCACACATTCCACGCCCTCCTT
2157600  TGCTGTACAATCCCAGGCAAGTCGCTCAGCTTCTCTGAGCCTCAGTTTCATAATCTGTCA
2157660  AATGGAGGTAACACAAATAATTCCTAGTTGTGACCAAGAATCATCATAGAAATCTGCCAT
2157720  TTCCAGCCTATTGTGCAATTCCTCAAGCACTGTGACTCCAAGTGGCATCAGCTCCTGGAA
2157780  GAACACACTGTCTTACTGTTGTTTCCTCCTTTGTCAACTGATCCCCCCTTGAACCTCACT
2157840  CTACCTCTGCTCTCAATGCCCCATCTACTGCCACCTGATTAAATAAAATCTTTTTTGAAA
2157900  ATCATAAGTGTCATGAGTAAGGTTTCTTGGTGTTGATGTAGAAGAACAAAACAGAATTGT
2157960  GAAATGAGAATCACTGCAGCTATCATGAAGTCCTGCCTAC
```

【図３－１】

FIGURE 3

配列番号20
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQN
```

配列番号21
```
  1 SVSRRDKSKQ VWEAVLLPLS LLMMDLRNTP AKSLDKFIED YLLPDTCFRM QIXHAIDIIC
 61 GFLKERCFRG SSYPVCVSKV VKGGSSGKGT TLRGRSDADL VVFLSPLTTF QDQLNRRGEF
121 IQEIRRQLEA CQRERAXSVK FEVQAPRWGN PRALSFVLSS LQLGEGVEFD VLPAFDALGQ
181 LTGXYKPNPQ IYVKLIEECT DLQKEGEFST CFTELQRDFL KQRPTKLKSL IRLVKHWYQN
```

配列番号22
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNVW PSHQAWWVLS RLGAEEG
```

配列番号23
```
  1 SVSRRDKSKQ VWEAVLLPLS LLMMDLRNTP AKSLDKFIED YLLPDTCFRM QIXHAIDIIC
 61 GFLKERCFRG SSYPVCVSKV VKGGSSGKGT TLRGRSDADL VVFLSPLTTF QDQLNRRGEF
121 IQEIRRQLEA CQRERAXSVK FEVQAPRWGN PRALSFVLSS LQLGEGVEFD VLPAFDALGQ
181 LTGXYKPNPQ IYVKLIEECT DLQKEGEFST CFTELQRDFL KQRPTKLKSL IRLVKHWYQN
241 VWPSHQAWWV LSRLGAEEG
```

配列番号24
```
  1 SVSRRDKSKQ VWEAVLLPLS LLSMMDLRNT PAKSLDKFIE DYLLPDTCFR MQIXHAIDII
 61 CGFLKERCFR GSSYPVCVSK VVKGGSSGKG TTLRGRSDAD LVVFLSPLTT PDQLNRRGE
121 FIQEIRRQLE ACQRERAXSV KFEVQAPRWG NPRALSFVLS SLQLGEGVEF DVLPAFDALG
181 QLTGXYKPNP QIYVKLIEEC TDLQKEGEFS TCFTELQRDF LKQRPTKLKS LIRLVKHWYQ
241 NVWPSHPACW YLYIFI
```

配列番号25
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLLKAT VQTMRPTIPG
361 XIRNMVTLEH MSTLISLIDP AHSRQHPPHR QKRTGPAPSS RCQCILGERA PVLSGPVPSF
421 SGGTLDPEXT KLLSELVYNP GQNPGLLTPG LLCPLSYHR
```

配列番号26
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLMKQR LREVRSLAQS
361 HQLTSGGNGI QAQWTLKPVL MSLC
```

【図３－２】

FIGURE 3

配列番号27
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLIKLR LREAK
```

配列番号28
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLIKLR LREAK
```

配列番号29
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLVNLT LVGRRNYPII
361 SEHAVNLQQT RXASLSYSFQ VA
```

配列番号30
```
  1 AESNSXDDET DDPRXYQKYG YIGTHEYPHF SHRPSTLQAA STPQAEEDWT CTIL
```

配列番号31
```
  1 GCTGAAAGCA ACAGTRCAGA CGATGAGACC GACGATCCCA GGASGTATCA GAAATATGGT
 61 TACATTGGAA CACATGAGTA CCCTCATTTC TCTCATAGAC CCAGCACACT CCAGGCAGCA
121 TCCACCCCAC AGGCAGAAGA GGACTGGACC TGCACCATCC TCTGAATGCC AGTGCATCTT
181 GGGGGAAAGG GCTCCAGTGT TATCTGGACC AGTTCCTTCA TTTTCAGGTG GGACTCTTGA
241 TCCAGAGARG ACAAAGCTCC TCAGTGAGCT GGTGTATAAT CCAGGACAGA ACCCAGGTCT
301 CCTGACTCCT GGCCTTCTAT GCCCTCTATC CTATCATAGA TAACATTCTC CACAGCCTCA
361 CTTCATTCCA CCTATTCTTT GAAATATTTC CCTGAGAGAG AACAGAGAGA TTTAGATAAG
421 AGAATGAAAT TCCAGCCTTG ACTTTCTTCT GTGCACCTGA TGGGAGGGTA ATGTCTAATG
481 TATTATCAAT AACAATAAAA ATAAAGCAAA TACCATTTA
```

配列番号32
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPR
```

【図３－３】

FIGURE 3

配列番号33
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLVRPP ASSLPFIPAP
361 LHEA
```

配列番号34
```
  1 MMDLRNFPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLAESN SXDDETDDPR
361 XYQKYGYIGT HEYPHFSHRP STLQAASTPQ AEEDWTCTIL
```

配列番号35
```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLTQHT PGSIHPTGRR
361 GLDLHHPLNA SASWGKGLQC YLDQFLHFQV GLLIQRXQSS SVSWCIIQDR TQVS
```

配列番号36
```
GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCAGGCAAG
GGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCTCACCACTTTTCAGGATCAGTT
AAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCATTTTCCGTGA
AGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCCGTGCCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAG
GGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAAT
CTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGGAGGGCGAGTTCTCCACCTGCTTCACAGAACTACAGA
GAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACAAGCTCAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATGTGTAAG
AAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGYCTATGCTGGGAGCGAGGGAGCATGAA
AACACATTTCAACACAGCCCAGGGATTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACT
GGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTG
ATCCTGGACCCGGCCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGC
TGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGGTGAGAC
CTCCTGCTTCCTCCCTGCCATTCATCCCTGCCCCTCTCCATGAAGCTTGAGACATATAGCTGGAGACCATTCTTTCC
AAAGAACTTACCTCTTGCCAAAGGCCATTTATATTCATATAGTGACAGGCTGTGCTCCATATTTTACAGTCATTTTG
GTCACAATCGAGGGTTTCTGGAATTTTCACATCCCTTGTCCAGAATTCATTCCCCTAAGAGTAATAATAAATAATCT
CTAACACCATTTATTGACTGTCTGCTTCGGGCTCAGGTTCTGTCCTAAGCCCTTTAATATGCACTCTCTCATTAAAT
A
```

配列番号37
```
GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCAGGCAAG
GGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCTCACCACTTTTCAGGATCAGTT
AAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCATTTTCCGTGA
AGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCCGTGCCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAG
GGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAAT
CTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGGAGGGCGAGTTCTCCACCTGCTTCACAGAACTACAGA
```

【図３－４】

FIGURE 3

GAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTCAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAG
AAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGACGATGAA
AACACATTTCAACACAGCCCAGGGATTTGGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACT
GGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTG
ATCCTGGACCGGCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGC
TGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGCTGAAAG
CAACAGTRCAGACGATGAGACCGACGATCCCAGGASGTATCAGAAATATGGTTACATTGGAACACATGAGTACCCT
CATTTCTCTCATAGACCCAGCACACTCCAGGCAGCATCCACCCCACAGGCAGAAGAGGCTGGACCTGCACCATCCTC
TGAATGCCAGTGCATCTTGGGGGAAAGGGCTCCAGTGTTATCTGGACCAGTTCCTTCATTTTCAGGTGGGACTCTTG

【図３－５】

FIGURE 3

ATCCAGAGARGACAAAGCTCCTCAGTGAGCTGGTGTATAATCCAGGACAGAACCCAGGTCTCCTGACTCCTGGCCTT
CTATGCCCTCTATCCTATCATAGATAACATTCTCCACAGCCTCATTCCTCACCTATTCCTGAAAATATTCCCT
GAGAGGAGAACAGAGAGATTTAGATAAGAGAATGAAATTCCAGCCTTGACTTTCTTCTGTGCACCTGATGGGAGGGTA
ATGTCTAATGTATTATCATAACATAAAAATAAAGCAAATACCATTTATTGGGTGTTTATTAACTTCAAGGCACAG
AGCCAAGAAGTACAGATGCATATCTAGGGGTATTGTGTGTGTATATACATTGATTCAACAAGAAATATTTATTGAGC
ACTT

配列番号 40

GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCCAGGCAAG
GGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCTCACCACTTTTCAGGATCAGTT
AAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCATTTTCCGTGA
AGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCCGTGCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAG
GGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAAT
CTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGAGGGCGAGTTCTCCACCTGTCTTCCTCCGTCTCCTT
GAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTCAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAG
AAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGACGATGAA
AACACATTTCAACACAGCCCAGGGATTTGGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACT
GGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTG
ATCCTGGACCGGCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGC
TGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGCTGAAAG
CAACAGTRCAGACGATGAGACCGACGATCCCAGGASGTATCAGAAATATGGTTACATTGGAACACATGAGTACCCTC
ATTTCTCTCATAGACCCAGCACACTCCAGGCAGCATCCACCCCACAGGCAGAAGAGGCTGGACCTGCACCATCCTC
TGAATGCCAGTGCATCTTGGGGGAAAGGGCTCCAGTGTTATCTGGACCAGTTCCTTCATTTTCAGGTGGGACTCTTG

配列番号 38

GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCCAGGCAAG
GGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCTCACCACTTTTCAGGATCAGTT
AAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCATTTTCCGTGA
AGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCCGTGCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAG
GGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAAT
CTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGAGGGCGAGTTCTCCACCTGTCTTCCTCCGTCTCCTT
GAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTCAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAG
AAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGACGATGAA
AACACATTTCAACACAGCCCAGGGATTTGGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACT
GGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTG
ATCCTGGACCGGCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGC
TGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGCTGAAAG
CAACAGTRCAGACGATGAGACCGACGATCCCAGGASGTATCAGAAATATGGTTACATTGGAACACATGAGTACCCTC
ATTTCTCTCATAGACCCAGCACACTCCAGGCAGCATCCACCCCACAGGCAGAAGAGGCTGGACCTGCACCATCCTC
TGAATGCCAGTGCATCTTGGGGGAAAGGGCTCCAGTGTTATCTGGACCAGTTCCTTCATTTTCAGGTGGGACTCTTG

配列番号 39

GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCCAGGCAAG
GGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCTCACCACTTTTCAGGATCAGTT
AAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCATTTTCCGTGA
AGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCCGTGCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAG
GGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAAT
CTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGAGGGCGAGTTCTCCACCTGTCTTCCTCCGTCTCCTT
GAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTCAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAG
AAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGACGATGAA
AACACATTTCAACACAGCCCAGGGATTTGGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACT
GGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTG
ATCCTGGACCGGCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGC
TGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGCTGAAAG

【図３－６】

FIGURE 3

TCACACTGGTTGGCAGAAGGAACTATACCAATAATTAGTGAACATGCGGTGAATTTGCAACAGACAAGASGAGCCTC
ATTATCCTATAGTTTCCAGGTTGCTTAGGGAGGCAGAAATCACAGCAAGGAAAACCTTCAATAATAAACAGACGTCT
CATAAAATTAATTGCAACCCAACCTCTCCTCTCTACTTAAAATTAGCATCTATTTCCAGCTCTGCTTTCAATGCCCCA
TATGAATACATGTGAACTCCCTCCCTCTCTTCCTCCCTGTCTCCTTCTCTCTCTCTGTCCCTCATTAAAAAATAA
AATTTAAGAAAAAAATACAAGGTAGATTTACACAAATAGTGGGATCTCAGTCTTGAGTTAGCTGTGTATGACTGAAA
AGGATGCTGTGGTTAATAATTATCATAAAAACAATGACATGGCCGGG

配列番号 42

GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCCAGGCAAG
GGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCTCACCACTTTTCAGGATCAGTT
AAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCATTTTCCGTGA
AGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCCGTGCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAG
GGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAAT
CTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGAGGGCGAGTTCTCCACCTGTCTTCCTCCGTCTCCTT
GAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTCAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAG
AAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGACGATGAA
AACACATTTCAACACAGCCCAGGGATTTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACT
GGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTG
ATCCTGGACCGGCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGC
TGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGCTGAAAG
CAACAGTRCAGACGATGAGACCGACGATCCCAGGASGTATCAGAAATATGGTTACATTGGAACACATGAGTACCCTC
ATTTCTCTCATAGACCCAGCACACTCCAGGCAGCATCCACCCCACAGGCAGAAGAGGCTGGACCTGCACCATCCTC
TGAATGCCAGTGCATCTTGGGGGAAAGGGCTCCAGTGTTATCTGGACCAGTTCCTTCATTTTCAGGTGGGACTCTTG

配列番号 43

GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCCTCAGGCAAG
GGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCACCACTTTTCAGGATCAGTT
AAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCATTTTCCGTGA
AGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCCGTGCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAG
GGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGGCRGCTATAAACCTAACCCCCAAAT
CTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGAGGGCGAGTTCTCCACCTGTCTTCCTCCGTCTCCTT
GAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTCAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAG
AAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGACGATGAA
AACACATTTCAACACAGCCCAGGGATTTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACT
GGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTG
ATCCTGGACCGGCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGC
TGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGCTGAAAG
G

【図３－７】

FIGURE 3

CACAGCCCAGGGATTTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACTGGACAAAGTATT
ATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTGATCCTGGACCCG
GCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGCTGAGGCCTGGCT
GAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGCTGAAACCTCACATGGTTG
GCGACAAGGAACTATCCAATAATTAGTGAACATGCGGTGAATTTGCAACAGACAAGASGAGCCTCATTATCCTATAGT
TTCCAGGTTGCTTAGGGAGGCAGAAATCACAGCAAGGAAAACCTTCAATAATAAACAGACGTCTCATAAAATTAATT
GCAACCCAACCTCTCCTCTCTACTTAAAATTAGCATCTATTTCCAGCTCTGCTTTCAATGCCCCATATGAATACATG
GAACTCCCTCCCTCTCTTCCTCCCTGTCTCCTTCTCTCTCTCTGTCCCTCATTAAAAAATAAAATTTAAGAAAAA
AATACAAGGTAGATTTACACAAATAGTGGGATCTCAGTCTTGAGTTAGCTGTGTATGACTGAAAAGGATGCTGTGGT
TAATAATTATCATAAAAACAATGACATGGCCGGG

配列番号 45

GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACAGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCCAGGCAAG
AAGCTCCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGAGCATGAAAACACATTTCAA
CACAGCCCAGGGATTTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACTGGACAAAGTATT
ATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTGATCCTGGACCCG
GCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGCTGAGGCCTGGCT
GAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGCTGAAACCTCACATGGTTG
GCGACAAGGAACTATCCAATAATTAGTGAACATGCGGTGAATTTGCAACAGACAAGASGAGCCTCATTATCCTATAGT
TTCCAGGTTGCTTAGGGAGGCAGAAATCACAGCAAGGAAAACCTTCAATAATAAACAGACGTCTCATAAAATTAATT
GCAACCCAACCTCTCCTCTCTACTTAAAATTAGCATCTATTTCCAGCTCTGCTTTCAATGCCCCATATGAATACATG
GAACTCCCTCCCTCTCTTCCTCCCTGTCTCCTTCTCTCTCTCTGTCCCTCATTAAAAAATAAAATTTAAGAAAAA
AATACAAGGTAGATTTACACAAATAGTGGGATCTCAGTCTTGAGTTAGCTGTGTATGACTGAAAAGGATGCTGTGGT
TAATAATTATCATAAAAACAATGACATGGCCGGG

配列番号 46

```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 CKKKLGKLPP QYALELLTVY AWERGSMKTH FNTAQGFRTV LELVINYQQL CIYWTKYYDF
121 KXPIIEKYLR RQLTKPRPVI LPPADPTGNL GGGDPKGWRQ LAQEAEAWLN YXCFKNWDGS
181 PVSSWILLVN LTLVGRRNYP IISEHAVNLQ QTRXASLSYS FQVA
```

配列番号 47

```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 CKKKLGKLPP QYALELLTVY AWERGSMKTH FNTAQGFRTV LELVINYQQL CIYWTKYYDF
121 KXPIIEKYLR RQLTKPR
```

配列番号 48

```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILL
```

配列番号 49

```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFN TAQGFRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDFKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKN
```

配列番号 50

```
  1 MMDLRNTPAK SLDKFIEDYL LPDTCFRMQI XHAIDIICGF LKERCFRGSS YPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RERAXSVKFE
121 VQAPRWXNPR ALSFVLSSLQ LGEGVEFDVL PAFDALGQLT GXYKPNPQIY VKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCF TELQRDFLKQ RPTKLKSLIR LVKHWYQNCK KKLGKLPPQY ALELLTVYAW
```

【図３－８】

FIGURE 3

241 ERGSMKTHFN TAQGPRTVLE LVINYQQLCI YWTKYYDPKX PIIEKYLRRQ LTKPRPVILD
301 PADPTGNLGG GDPKGWRQLA QEAEAWLNYX CFKNWDGSPV SSWILLAESN SXD

配列番号 51
1 MMDLRNTPAK SLDKPIEDYL LPDKCFRKQI NHAIDIICGF LKERCFQGSS YPVHVSKVVK
61 GGSSGKGTTL RGRSDADLVV FLSPLTTFQD QLNRRGEFIQ EIRRQLEACQ RESRAFSVKF
121 EVQAPRWDNP RALSFVLSSL QLGEGVSFDV LPAFDALGQL TDGYKPDPQI YVKLIEECTY
181 LQKEGEFSTC FTELQRDFLK QRPTKLKSLI RLVKHWYQNC KKKLGKLPPQ YALELLTVYA
241 WEQGSMETDF NTAQEFRTVL ELVINYQQLC IYWTKYYDFE NPIIEKYLRR QLTKPRPVIL
301 DPADPTGNLG GDPKGWRQL AQEAEAWLNY PCFKN

配列番号 52
1 PVILDPADPT GNLGGGDPKG WRQLAQEAEA WLNYPCFKNW DGSPVSSWIL LAESDSGR

配列番号 55
GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTT
CATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACAAGTGTTTCCGCAAGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGTGAGGTTCC
TGAAGGAAAGGTGCTTCCAAGGTAGCTCCTACCCTGTGCATGTGTCCAAGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCAGGCAAG
GGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCTCACCACTTTTCAGGATCAGTT
AAATCGCCGGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGGAGAAGAGCATTTTCCG
TGAAGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGACAACCCCGTGCGCTCAGCTTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGG
GAGGGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCCTTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGACGGCTATAAACCTGACCCCCA
AATCTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCTACCTGCAGAAAGAGGGCGAGTTCTCCACCTGCTTCACAGAACTAC
AGAGAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTCAAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGT
AAGAAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCAAGGAGACAT
GGAAACAGATTTCAACACAGCCCAGGAATTTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCT
ACTGGACAAAGTATTATGACTTGAAAACCCCATTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCT
GTGATCCTGGACCCGGCGGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGA
GGCTGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGAGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGGTGA
GACCTCCTGCTTCCTCCCTGCATTCATCCCTGCCCCTCTCCATGAAGCTTGAGACATATAGCTGGAGACCATTCTT
TCCAAAGAACTTACCTCTTGCCAAAGGCCATTTATATTCATATAGTGACAGGCTGTGCTCCATATTTTACAGTTATT
TTGGTCACAATCGAGGGTTTCTGGAATTTTCACATCCCTTGTCCAGAATTCATTCCCCTAAGAGTAATAATAAATAA
TCTCTAACAC

配列番号 56
GCCTGTGATCCTGGACCCGGCAGACCCTACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCAC
AAGAGGCTGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTG
GCTGAAAGCGACAGTGGACGATGAGACCGACGATCCCAGGAGGTATCAGAAATATGGTTACATTGGAACACATGAGT
ACCCTCATTTCTCTCATAGACCCAGCACACTCCAGGCAGCATCCACCCCACAGGCAGAAGAGGACTGGACCTGCACC
ATCCTCTGAATGCYAGTGCATCTTGGGGGAAAGGGCTCCAGTGTTATCTGGACCAGTTCCTTCATTTCAGGTGGGA
CTCTTGATCCAGAGAGGACAAAGCTCCTCAGTGAGCTGGTGTATAATCCAGGACAGAACCCAGGTCTCCTGACTCCT
GGCCTTCTATGCCCTCTATCCTATCATAGATAACATTCTCCACAGCCTCACTTCATTCCACCTATTCTCTGAAAATA
TTCCCTGAGAGAGAACAGAGAGATTTAGATAAGAGAATGAAATTCCAGCCTTGACTTTCTTCTGTGCACCTGATGGG
AGGGTTATGTCTAATGTATTATCAATAACAGTAAAAATAAAGCAAATGCC

上記のヌクレオチド配列に関して(配列番号31、配列番号36～配列番号45、および配列番号55～配列番号56):
RはAまたはGを示す
SはGまたはCを示す

上記のアミノ酸配列に関して(配列番号20～配列番号30、配列番号32～配列番号35、および配列番号46～配列番号52):
Xは、以下の表のアミノ酸改変体を示す

配列番号	アミノ酸位置	アミノ酸

【図３－９】

FIGURE 3

20	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	GまたはS
21	53	DまたはN
	137	LまたはF
	184	GまたはS
22	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	GまたはS
23	53	DまたはN
	137	LまたはF
	184	GまたはS
24	64	DまたはN
	138	LまたはF
	185	GまたはS
25	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	GまたはS
26	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
27	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
	361	GまたはR
	429	KまたはR
28	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
29	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR

【図３－１０】

FIGURE 3

	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
	372	RまたはG
30	6	AまたはT
	15	RまたはT
32	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
33	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
34	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
	352	AまたはT
	361	RまたはT
35	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
	397	GまたはR
46	31	DまたはN
	122	NまたはT
	172	PまたはS
	214	RまたはG
47	31	DまたはN
	122	NまたはT
48	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
49	31	DまたはN

【図３－１１】

FIGURE 3

	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
50	31	DまたはN
	115	LまたはF
	127	GまたはR
	162	SまたはG
	280	NまたはT
	330	PまたはS
	352	AまたはT

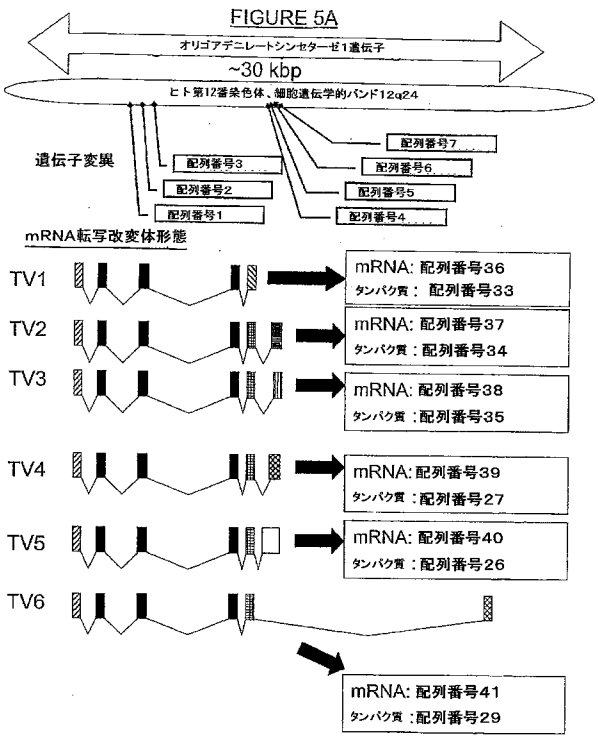
【図４】

FIGURE 4

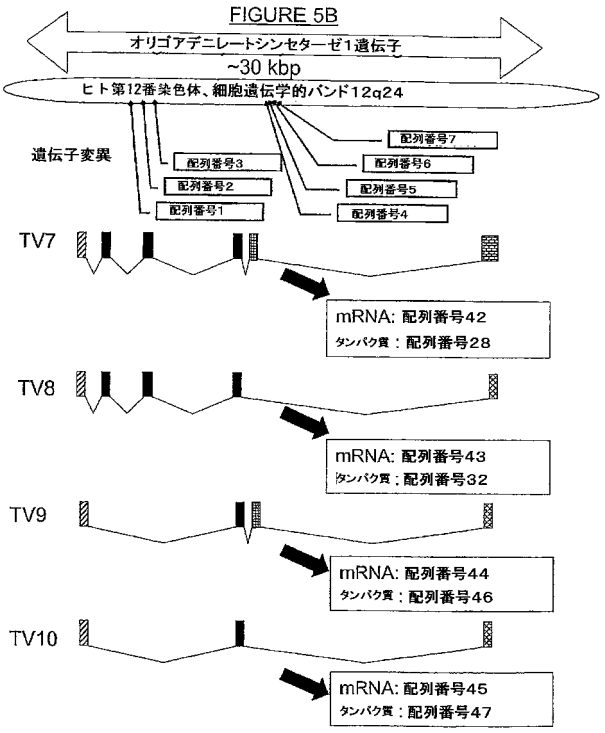
事例の被検体および対照の被検体から推測される集団のハプロタイプ

推測されるハプロタイプ	おおよその集団頻度	配列番号2の対立遺伝子	配列番号3の対立遺伝子	配列番号4の対立遺伝子	配列番号5の対立遺伝子
HAP1	54%	A	G	A	A
HAP2	32%	G	G	G	G
HAP3	8%	G	A	A	A
HAP4	5%	G	G	G	A
HAP5	<1%	A	G	G	G
HAP6	<1%	G	G	A	A

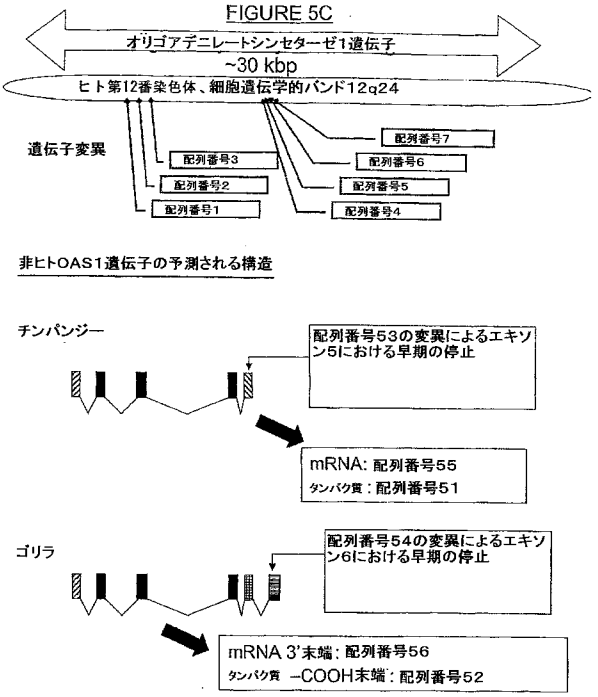
【図５Ａ】



【図５Ｂ】



【図５Ｃ】



【図６】

FIGURE 6

非ヒト霊長類の変異

配列番号53
生物：*Pan troglodytes*
ヒトと比較した改変 ：A（Gに対するAの置換）
相同的なヒトゲノム配列 Genbank 登録番号：NT_009775.13
ヒトゲノム配列上の変異の座標（開始-終止）：2,142,351-2,142,351
生物の局所的に同定されたゲノム配列コンテキスト
CTGGCACAAGAGGCTGAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTG
A
GATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGGTGAGACCTCCTGCTTC

配列番号54
生物：*Gorilla gorilla*
ヒトと比較した改変 ：– (CAの2塩基対欠失)
相同的なヒトゲノム配列 Genbank 登録番号：NT_009775.13
ヒトゲノム配列上の変異の座標（開始-終止）：2,144,089-2,144,090
生物の局所的に同定されたゲノム配列コンテキスト
CTCCCTGATGTGATCATGTGTCTCACCCTTTCAGGCTGAAAGCGACAGTG
– –
GACGATGAGACCGACGATCCCAGGAGGTATCAGAAATATGGTTACATTGG

太字の一重下線の塩基は、各配列番号によって同定されるヒトと比較した特定の生物の改変を示す。

二重下線の塩基は、ヒトゲノム配列と示された生物との間の他の共存する改変体を示す。

変化する核酸は、以下：
R=A/G
Y=C/T
S=C/G
K=G/T
をコードする。

【図７】

FIGURE 7
E. coliが産生したタンパク質のオリゴアデニレートシンセターゼ1活性

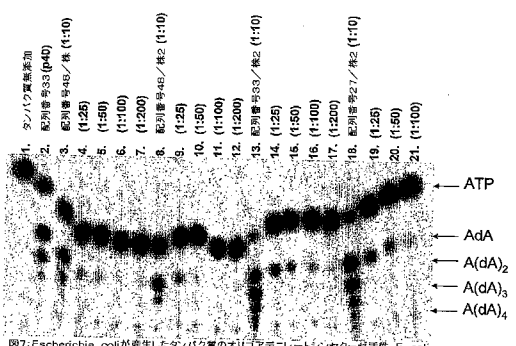


図7：Escherichia coliが産生したタンパク質のオリゴアデニレートシンセターゼ活性。E. coliにおいて産生されたオリゴアデニレートシンセターゼ1酵素の活性(レーン3~21)を、パキュロウイルス発現系において産生された酵素(レーン2)に対して比較した。E. coli試料を、2つの細菌株のいずれか1つにおいて産生し、そして1:10(レーン3、レーン8、レーン13、およびレーン18)、1:25(レーン4、レーン9、レーン14、およびレーン19)、1:50などに希釈した。酵素反応を、α32 PdATPの存在下で行い、そして酵素産物を、ポリエチルイミンセルロースでコートされたプレート上の薄層クロマトグラフィーによって分離した。2'-5'-オリゴアデニレートの唯一知られる機能は、細胞の抗ウイルス応答を刺激することである。

【図８】

FIGURE 8
E. coliが産生したタンパク質のオリゴアデニレートシンセターゼ1活性

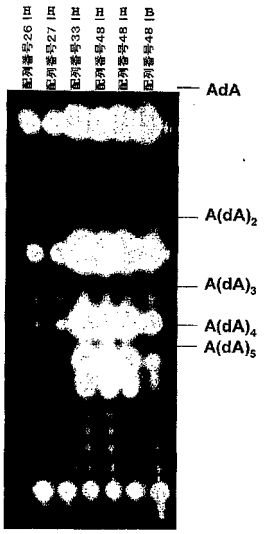


図8：HeLa細胞において発現したOAS1アイソフォームの活性。OAS1アイソフォームを、一過性のトランスフェクションによってHeLa細胞中で発現させ、そして組換細胞溶解物を、基質として α32PdATPを使用して、オリゴアデニレートの形成を触媒するそれらの能力によって、酵素活性について評価した。オリゴアデニレートを、12%のアクリルアミド/ビス-アクリルアミドゲルにおける変性ゲル電気泳動によって分離した。粗製HeLa抽出物(H)を、細菌(B)において発現させて細菌(B)から精製した酵素に対して比較した。

【図９】

FIGURE 9
OAS1の新規な形態に対して特異的な抗体の開発

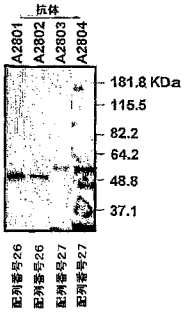


図9：新規なOAS1形態に対して特異的な抗体。ポリクローナル抗体を、ウサギ免疫によって各OAS1形態の固有の部分に由来する合成ペプチド配列に対して惹起した。各抗体は、ウサギ網状赤血球溶解物共役型の転写-翻訳システムにおいて、インビトロで合成されたタンパク質に対して試験された。

【図１０】

FIGURE 10
例示的なタンパク質変換ドメインシステム

配列番号	ポリペプチド配列
配列番号 85	YGRKKRRQRRR
配列番号 86	RQIKIWFQNRRMKWKK
配列番号 87	MTSRRSVKSGPREVPRDEYEDLYYIPSSGMASPDSPPD TSRRGALQTRSRQRGEVRFVQYDESDYALYGGSSSEDD EHPEVPRTRRPVSGAVLSGPGPARAPPPPAGSGGAGRTP TTAPRAPRTQRVATKAPAAPAAETTRGRKSAQPESAAL PDAPASTAPTRSKTPAQGLARKLHFSTAPPNPDAPWTPR VAGFNKRVFCAAVGRLAAMHARMAAVQLWDMSRPRT DEDLNELLGITTIRVTVCEGKNLLQRANELVNPDVVQDV DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE
配列番号 88	MSRKLFASILIGALLGIGAPPSAHAGADDVVDSSKSFVM ENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGN YDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVV KVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLM EQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWE QAKALSVELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQA CAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHG PIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTAL EHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSET ADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNT EEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIIN LFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYA VSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLP TIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAID GDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKIHSNE ISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEIKS
配列番号 89	GDIMGEWGNEIFGAIAGFLG
配列番号 90	RRRRRRR
配列番号 91	RRQRRTSKLMKR
配列番号 92	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
配列番号 93	WEAKLAKALAKALAKAHLAKALAKALKACEA
配列番号 94	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV

【配列表】
2011142913000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N 1/21			4C076
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N 5/00	101		4C084
C07K 16/40	*(2006.01)*	C07K 16/40			4C085
C12P 21/02	*(2006.01)*	C12P 21/02		C	4C086
C12N 15/113	*(2010.01)*	C12N 15/00		G	4H045
A61K 38/43	*(2006.01)*	A61K 37/48			
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K 48/00			
A61K 47/48	*(2006.01)*	A61K 47/48			
A61K 9/127	*(2006.01)*	A61K 9/127			
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K 39/395		N	
A61K 31/7088	*(2006.01)*	A61K 31/7088			
A61K 31/7105	*(2006.01)*	A61K 31/7105			
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K 39/395		Y	
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61K 45/00			
A61P 25/18	*(2006.01)*	A61P 3/10			
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P 25/18			
A61P 31/12	*(2006.01)*	A61P 35/00			
C12P 21/08	*(2006.01)*	A61P 31/12			
		C12P 21/08			

(31)優先権主張番号 60/560,524
(32)優先日 平成16年4月8日(2004.4.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/578,323
(32)優先日 平成16年6月9日(2004.6.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/583,503
(32)優先日 平成16年6月28日(2004.6.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/605,243
(32)優先日 平成16年8月26日(2004.8.26)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ショーン・ピー・イアドネイト
アメリカ合衆国 ワシントン ９８１２２, シアトル, ３１エスティー アベニュー ４２１
(72)発明者 チャールズ・エル・マグネス
アメリカ合衆国 ワシントン ９８１１５, シアトル, ピー．オー． ボックス ５１１８２
(72)発明者 ガリー・ローゼンバーグ
アメリカ合衆国 ワシントン ９８０２１, ボセル, ２３アールディー アベニュー エスイー ２３５１９
(72)発明者 クリスティーナ・エー・シェーラー
アメリカ合衆国 ワシントン ９８１１９, シアトル, １２ティーエイチ アベニュー ダブリュー １８３７
(72)発明者 チエリー・ギアド
フランス国 エフ－３５０００ レンヌ, ルー モット バリル, ４０

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA07 CA11 CA20 HA14
4B050 CC03 CC07 DD11 LL01

4B063 QA07 QQ03 QQ52 QR32 QR56 QR62 QS25 QS34 QX07
4B064 AG01 AG27 CA19 DA01 DA15
4B065 AB01 AC14 BA01 CA27 CA44 CA46
4C076 AA19 AA95 CC35 CC42 CC47 EE23 EE30 EE59M EE59N EE59Q
FF31 FF34 FF65 FF66
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA02 BA22 BA34 BA37 BA41 BA42
CA53 CA59 DC01 DC32 MA05 MA16 MA24 MA34 MA37 MA52
MA59 MA63 MA66 NA14 ZA181 ZB261 ZB331 ZC192 ZC202 ZC351
4C085 AA14 AA17 AA34 BB22 BB41 CC02 CC21 CC22 DD62 DD63
DD88 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA16 MA24 MA34 MA52 MA59
MA63 MA66 NA14 ZA18 ZB26 ZB33 ZC20 ZC35
4H045 AA11 CA42 DA76 EA29 FA71

【外国語明細書】
2011142913000001.pdf