

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4323720号
(P4323720)

(45) 発行日 平成21年9月2日(2009.9.2)

(24) 登録日 平成21年6月12日(2009.6.12)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
A 6 1 K	39/12	(2006.01)	A 6 1 K	39/12
C 0 7 K	14/18	(2006.01)	C 0 7 K	14/18
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/569

請求項の数 8 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2000-548432 (P2000-548432)	(73) 特許権者	506196247
(86) (22) 出願日	平成11年5月6日(1999.5.6)		インターベツト・インターナショナル・ベ ー・ペー
(65) 公表番号	特表2002-514407 (P2002-514407A)		オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツ クスメール、ウイム・ドウ・コルベルスト ラート・35
(43) 公表日	平成14年5月21日(2002.5.21)	(74) 代理人	100062007
(86) 国際出願番号	PCT/EP1999/003244		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開番号	W01999/058639	(74) 代理人	100114188
(87) 国際公開日	平成11年11月18日(1999.11.18)		弁理士 小野 誠
審査請求日	平成18年2月10日(2006.2.10)	(74) 代理人	100140523
(31) 優先権主張番号	98201461.5		弁理士 渡邊 千尋
(32) 優先日	平成10年5月8日(1998.5.8)	(74) 代理人	100119253
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 魚豚臓病ウイルス構造タンパク質およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする魚豚臓病ウイルスの構造タンパク質。

【請求項 2】

請求項 1 に記載される魚豚臓病ウイルスの構造タンパク質をコードするヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載されるタンパク質または請求項 2 に記載されるヌクレオチドを含む薬学的組成物。

【請求項 4】

非ヒト動物の医薬として使用するための請求項 1 に記載されるタンパク質または請求項 2 に記載されるヌクレオチド。

【請求項 5】

薬学的に許容可能なキャリアと、請求項 2 に記載のヌクレオチドが転写調節配列に機能的に連結されている DNA プラスミドを含む DNA ワクチン。

【請求項 6】

請求項 2 に記載のヌクレオチドの 1 つまたは複数をその遺伝物質に含むように改変されている弱毒化された生細菌または生ウイルスを含むベクターワクチン。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の構造 P D タンパク質と薬学的に許容可能なキャリアとを含むワクチン

10

20

。【請求項 8】

請求項 1 に記載のタンパク質または請求項 2 に記載の 1 つまたは複数のヌクレオチドまたはそのフラグメントを含む診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、魚類における膵臓病 (Pancreatic Disease) の病原体の構造タンパク質、そのようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列、そのようなタンパク質またはヌクレオチド配列を含むワクチン、およびそのようなタンパク質またはヌクレオチド配列を含む診断キットに関する。

10

【0002】

膵臓病 (PD) は、魚類、特に、野生の大西洋サケ、ニジマスなどのサケ科の魚がかかる重大な病気である。この病気は、膵臓の外分泌組織の喪失を含む膵臓での傷害、ならびに線維症、心筋ミオパシーおよび骨格筋ミオパシーを引き起こす。PD の発生は、1984 年に、Munro 他によって、Helgoland Meeresuntersuchungen、37:571~586 (19984) に最初に報告された。PD は、典型的には、海洋環境に移った初年度での魚の生え変わり (post-molts) を冒し、海洋ケージで飼育されている養殖魚に間に急速に広まっていることが報告されている。臨床的な兆候には、ケージの隅に集まって、水平位を維持できない傾向を伴う嗜眠、採餌の中断 (食欲不振)、および著しい死亡率が含まれる (Ferguson 他、J. Fish Disease、9:95~98、1986)。Murphy 他 (J. Fish Disease、15:401~408、1992) はこれらの結果を最近の研究で確認した。その際、心筋ミオパシーおよび骨格筋ミオパシーは PD に罹った魚で悪化することが見出された。

20

【0003】

養魚場における PD の発生は生育を低下させ得るし、生き残った魚の 10% までが生育不良であることが明らかにされることがある。アイルランドの養魚場において、PD による幼魚の 10~60% の大きな死亡率が、海洋環境に移った初年度中に生じている (McLoughlin, M., Fish Farmer、19 頁、3 月 / 4 月、1995)。生産高の損失に関してアイルランド産業の推定費用は、現在、年間約 2500 万ポンドであると考えられている。従って、魚の PD の予防および / または処置に必要なワクチンが非常に求められている。

30

【0004】

欧州特許公開 EP - A - 712926 には、PD の病原体が PD 感染魚の組織から単離され、ウイルスがトガ様ウイルスとして同定されたことが記載されている。それにより、魚における PD 感染を防止するために、弱毒化 PD または不活化 PD を魚のワクチン接種のために使用することが提案されている。欧州特許公開 EP - A - 712926 に記載された PD ウイルス由来の不活化ワクチンの製造における欠点は、ウイルスの増殖が、特に細胞培養において遅いことである。このため、そのようなワクチンの製造は比較的非効率的な方法になっている。不活化ワクチンに関するさらなる欠点は、他の不活化病原体の存在下で不活化ワクチンが不安定であり、効力の喪失が生じることである。魚のワクチンは、一般には多価ワクチンとして製造され、従って、多価ワクチンでは、一価ワクチンで必要とされるよりも著しく多い量の不活化ウイルスが、効力の喪失を補うために必要とされる。

40

。【0005】

本発明は、上記の困難が克服された、PD による魚の感染を防止する代わりにワクチンを製造するための手段を提供する。本発明は、サケ PD ウイルス (SPDV) のゲノム RNA の 3' 部分のヌクレオチド配列を提供する。5179ヌクレオチドのこの配列は配列番号 1 に示され、いくつかのオープンリーディングフレーム (ORF) を含む：コード鎖のヌクレオチド 2~1186 は非構造タンパク質をコードし、ヌクレオチド 997 から始ま

50

リヌクレオチド5076までの別の重複したORFはいくつかの構造タンパク質をコードしている。このORFはp130と呼ばれた。明らかにされなかった他のORFがコード鎖(3447~3767および4289~4612)および非コード鎖(1207~890および1232~837)で見出された。

【0006】

ヌクレオチド2~1186に由来するORFは、NSP4と呼ばれる非構造タンパク質のC末端部をコードする。その推定アミノ酸を配列番号2に示す。

【0007】

ORF p130は、PDウイルスの構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。PDウイルスの構造タンパク質は、塩基性のキャプシドタンパク質、E1、E2およびE3と呼ばれる3つのエンベロープタンパク質、ならびに6Kタンパク質と呼ばれるタンパク質からなる。p130のORFによってコードされる全タンパク質のアミノ酸配列を配列番号3に示す。プロセッシング後、p130タンパク質は、キャプシドタンパク質(p130のaa76~375)、E3(p130のaa358~428)、E2(p130のaa429~866)、6K(p130のaa867~898)およびE1(p130のaa899~1359)にスプライシングされる。

10

【0008】

PDウイルスのキャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド1222~2067に位置する。その対応するアミノ酸配列(全部で282アミノ酸)を配列番号4に示す。

20

【0009】

エンベロープタンパク質E3、E2およびE1をコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号1に示されるヌクレオチド配列のヌクレオチド2068~2280、2281~3594および3691~5076に位置する。E3タンパク質、E2タンパク質およびE1タンパク質の対応するアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号5、6および8に示す。

【0010】

6Kタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列のヌクレオチド3595~3690に位置する。6Kタンパク質の対応するアミノ酸配列を配列番号7に示す。PD感染の脾臓組織から抽出されたウイルスRNAのさらなる配列分析によって、配列番号7に示される32アミノ酸の6Kタンパク質と比較して、68アミノ酸の長さを有する6Kタンパク質のより長い変化体の存在が明らかにされた。6Kタンパク質のこのより長い変化体をコードするヌクレオチド配列(配列番号14)は、短縮型の6Kタンパク質をコードするヌクレオチド配列の96ヌクレオチドと比較して、長さが204ヌクレオチドである。6Kタンパク質のこの長い変化体をコードするヌクレオチド配列およびその推定アミノ酸配列を、それぞれ、図2ならびに配列番号14および配列番号15に示す。

30

【0011】

本発明のヌクレオチド配列のクローニングおよび特徴づけが行われることによって、PDウイルスの構造タンパク質の製造が、標準的な組換えDNA技術(Sambrooke他、Molecular Cloning: a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、1989)を使用して提供される。クローニング技術およびインビトロでの発現システムを使用するその後のタンパク質発現は、当分野では周知である。このようにして、他のPDVタンパク質を実質的に含まない組換え体の構造PDVタンパク質を得ることができる。これらの単離された構造タンパク質を使用して、魚のPD感染から保護するためのサブユニットワクチンを製造することができる。このようなサブユニットワクチンは、PDによる野外感染からワクチン接種を区別するための魚でのマーカーワクチンとして使用することができる。あるいは、PDウイルスの構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列を使用して、魚のPDによる感染から保護するためのDN

40

50

Aワクチンまたはベクターワクチンを製造することができる。ヌクレオチド配列および組換えPDタンパク質は、診断目的に、例えば、野外でのPDウイルスまたは魚における抗PD抗体の存在を検出するためにさらに使用することができる。さらに、本発明の組換えPDタンパク質は、PDに特異的な抗体を製造するために使用することができる。このような抗体はまた、魚または野外でのPDウイルスの検出などの診断目的に使用することができる。

【0012】

従って、第1の局面において、本発明は、PDウイルスのNSP4の構造タンパク質またはその一部をコードする配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列、そのようなヌクレオチド配列のフラグメント、および配列番号14に示されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を提供する。本発明によるヌクレオチド配列の好ましいフラグメントは、ヌクレオチドフラグメント1222~5076（これはまた、キャプシド、E3、E2、6KおよびE1のタンパク質をコードするp130として示される）、2068~5076（これはまた、E3、E2、6KおよびE1のタンパク質をコードするp98として示される）、2068~3594（これはまた、E3およびE2のタンパク質をコードするpE2として示される）、1222~2067（キャプシド）、2068~2280（E3）、2281~3594（E2）、3595~3690（6K）、および3691~5076（E1）である。本発明の目的のために、本発明によるヌクレオチド配列はまた、配列番号1に示されるヌクレオチド配列、および6Kタンパク質をコードするヌクレオチド配列を少なくとも含むそのフラグメント配列（p130およびp98のフラグメントなど）を包含する。この場合、配列番号1のヌクレオチド3595~3690によって示されるヌクレオチド配列は、配列番号4に示されるヌクレオチド配列で置換される。

【0013】

本発明の範囲内には、配列番号1または配列番号14に示される配列を含むヌクレオチド配列のタンデム配列を含むヌクレオチド配列またはそのフラグメントもまた含まれる。配列番号1、配列番号14に示される配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列もまた、配列番号1または配列番号14に示される配列とハイブリダイゼーションするヌクレオチド配列と同様に本発明の範囲内に含まれる。この目的に必要なハイブリダイゼーション条件はストリンジェントであり、好ましくは高度にストリンジェントである。本発明により、用語「ストリンジェント」は、 $1 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$ の65の温度での洗浄条件を意味する。高度にストリンジェントな条件は、 SSC を $0.3 \times SSC$ に低下させることをいう。

【0014】

配列番号1または配列番号14に示される配列とハイブリダイゼーションするヌクレオチド配列は、配列番号1または配列番号14に示される配列の対応する一致部分と少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%の配列相同性を有するヌクレオチド配列であると理解される。本発明によれば、配列相同性は、ヌクレオチド配列を、配列番号1または配列番号14に示される配列の対応する一致部分と比較することによって決定される。ヌクレオチドと配列番号1または配列番号14における配列との配列相同性は、BLASTNなどの一般的な配列分析プログラムによって決定することができる。最適な一致領域がこのようなプログラムによって自動的に決定される。相同的な配列は、日常的なクローニング技術およびハイブリダイゼーション技術を使用して、配列番号1または配列番号14に示される配列またはそのような配列のフラグメントを用いて密接に関連するPDウイルス株から容易に単離することができる。睡眠病(SD)ウイルスは、PDウイルスと密接に関連しており、SDウイルスの構造的なキャプシド、E3、E2、E1および6Kのタンパク質をコードする核酸配列は、配列番号1および14に示される核酸配列との必要な配列相同性を有している。従って、SDのこれらの核酸配列もまた本発明の範囲内に含まれる。

【0015】

本発明のヌクレオチド配列は、PD感染に対して魚にワクチン接種するためのDNAワクチンの製造において使用することができる。DNAワクチン接種は、直接接種されたDNAプラスミドに挿入された遺伝子からインビボで発現される1つまたは複数の抗原に対する免疫応答をワクチン接種された魚に誘導することである。従って、本発明の第2の局面において、薬学的に許容可能なキャリアと、1つまたは複数のPDV構造タンパク質をコードするヌクレオチド配列が転写調節配列に機能的に連結されているDNAプラスミドを含むDNAワクチンが提供される。

【0016】

好ましくは、このようなDNAプラスミドにおいて使用され得るヌクレオチド配列は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列、または配列番号14に示されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列、またはそのようなヌクレオチド配列のフラグメントである。配列番号1または14に示されるヌクレオチド配列の好ましいフラグメントは、配列番号1に示される配列のヌクレオチドフラグメント1222~5076、2068~5076、2068~3594、1222~2067、2068~2280、2281~3594、3595~3690、3691~5076であり、それらの組み合わせ（例えば、フラグメント1222~2067とフラグメント2281~3594との組み合わせ）である。さらに、そのようなDNAプラスミドにおける使用に好適なものは、配列番号1または配列番号14の配列に、あるいは配列番号1または配列番号14の配列に示される配列との配列相同性が少なくとも70%、好ましくは80%であり、より好ましくは90%であるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列である。DNAプラスミドにおける使用に好適なヌクレオチド配列同士の配列相同性は、上記のように決定される。

【0017】

本発明によるDNAワクチンにおける使用に好適なDNAプラスミドは、細菌、真核生物および酵母の宿主細胞に対する従来のクローニング用プラスミドまたは発現用プラスミドであり、これらの多くは市販されている。そのようなプラスミドの周知の例は、pBR322およびpcDNA3 (Invitrogen) である。本発明によるDNAプラスミドは、ヌクレオチド配列のタンパク質発現が誘導できなければならない。DNAプラスミドは、本発明による1つまたは複数のヌクレオチド配列を含むことができる。さらに、DNAプラスミドは、メチル化されていないCpGジヌクレオチドを有する免疫刺激性オリゴヌクレオチドなどの他のヌクレオチド配列、あるいは他の抗原性タンパク質または補助性サイトカインをコードするヌクレオチド配列を含むことができる。

【0018】

本発明によるDNAプラスミドにおける使用に好適な転写調節配列には、下記のプロモーターが含まれる：例えば、(ヒト)サイトメガロウイルス即時初期プロモーター (Seed, B. 他、Nature、329、840~842、1987; Fynan, E. F. 他、PNAS 90、11478~11482、1993; Ulmer, J. B. 他、Science、259、1745~1748、1993)、ラウス肉腫ウイルスLTR (RSV、Gorman, C. M. 他、PNAS、79、6777~6781、1982; Fynan 他、上記; Ulmer 他、上記)、MPSV LTR (Stacey 他、J. Virology、50、725~732、1984)、SV40即時初期プロモーター (Sprague J. 他、J. Virology、45、773、1983)、メタロチオネインプロモーター (Brinster, R. L. 他、Nature、296、39~42、1982)、Ad2の主要後期プロモーター、 γ -アクリンプロモーター (Tang 他、Nature、356、152~154、1992)。調節配列はまたターミネーター配列およびポリアデニル化配列を含むことができる。使用され得る配列の中で、周知のものは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、SV40ポリアデニル化配列、ヒトサイトメガロウイルス (hCMV) のターミネーター配列およびポリアデニル化配列である。

【0019】

10

20

30

40

50

本発明によるワクチンにおいて使用される転写調節配列に機能的に連結された本発明によるヌクレオチド配列を含むDNAプラスミドは、送達システムにおいて裸(naked)であり得るか、またはパッケージされ得る。好適な送達システムは、脂質ベシクル、イソコム(Isocom)、デンドロマー、ニオソーム(niosome)、多糖類マトリックスなどである。さらに、送達システムとして非常に好適なものに、サルモネラなどの弱毒化された生細菌がある。

【0020】

本発明によるヌクレオチド配列は、さらに、PDに対して魚をワクチン接種するためのベクターワクチンの製造において使用することができる。ベクターワクチンは、生の弱毒化細菌または弱毒化ウイルスが、その遺伝物質に挿入された1つまたは複数の異種ヌクレオチド配列を含有するように改変されたワクチンであると理解される。これらのいわゆるベクター細菌またはベクターウイルスは、挿入されたヌクレオチドによってコードされた異種タンパク質を同時に発現することができる。従って、第3の局面において、本発明は、1つまたは複数の本発明のヌクレオチド配列をその遺伝物質に含むように改変された生の弱毒化細菌または弱毒化ウイルスを含むベクターワクチンを提供する。ワクチンベクターとして使用される非常に好適なものは、例えば、ワクシニアウイルスまたはセムリキ森林ウイルスである。

【0021】

本発明によるヌクレオチド配列はまた、他のPDタンパク質を実質的に含まない構造PDタンパク質の組換え製造に使用することができる。従って、第4の局面において、本発明は、PDウイルスに由来する構造タンパク質を提供する。より詳細には、本発明は、PDのキャプシドタンパク質、PDのエンベロープタンパク質E1、E2およびE3、ならびに6Kタンパク質を提供する。特に、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するキャプシドタンパク質またはその誘導體、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有するE3タンパク質またはその誘導體、配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するE2タンパク質またはその誘導體、配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するE1タンパク質またはその誘導體、および配列番号7、配列番号15に示されるアミノ酸配列を有する6Kタンパク質またはその誘導體が提供される。

【0022】

誘導體タンパク質は、本発明のアミノ酸における変化を有するタンパク質であって、このようなタンパク質の抗原性および/または免疫原性が変化していないタンパク質であると理解される。すなわち、これらの誘導體タンパク質は、依然として、PDウイルスを認識してPDウイルスと(交差)反応する抗体の産生を誘導することができ、かつ/またはPD感染から保護される魚における免疫応答を誘導することができる。抗原性は、PDウイルスを認識してPDウイルスと(交差)反応する抗体の産生を誘導し得る能力であると理解される。免疫原性は、PDによる感染から保護される魚における免疫応答を誘導し得る能力であると理解される。本発明による配列に存在し得る変化は、例えば、配列全体におけるアミノ酸(1つまたは複数)の保存的アミノ酸置換、欠失、挿入、反転または付加から生じ得る。免疫学的性質を変化させないと考えられるアミノ酸置換を説明する。関連するアミノ酸同士のアミノ酸置換、または進化において頻発したアミノ酸置換は、特に、Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Valである(Dayhof, M.D., タンパク質配列および構造のアトラス, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, 第5巻, 増補3を参照のこと)。この情報に基づいて、LipmanおよびPearsonは、配列相同性を有するタンパク質およびペプチドの間における機能的類似性を明らかにする迅速で高感度のタンパク質比較法を開発した(Science, 1985, 第227巻, 1435~1441)。本発明による誘導體タンパク質は、依然として、PDウイルスを認識してPDウイルスと(交差)反応する抗体の産生を誘導することができ、かつ/またはPD感染から保護される魚における免疫応答を誘導することができる。睡眠病(SD)ウイルスから得られるキャプシドタンパク質、E1タンパク質、E2タンパク質、E3タンバ

10

20

30

40

50

ク質および6Kタンパク質は、本発明によるそのような誘導体タンパク質である。これらのタンパク質は、配列番号4～8または15に示されるPDウイルスのアミノ酸配列と同一であるか、またはほとんど同一であるアミノ酸配列を有する。これらのタンパク質は、PDウイルスならびにSDウイルスを認識してそれらと交差反応する抗体を惹起することができる。他の誘導体は、依然として、PDウイルスを認識してPDウイルスと(交差)反応する抗体の誘導を誘導することができ、かつ/または魚における免疫応答を誘導することができるタンパク質フラグメントである。

【0023】

本発明によるタンパク質は、標準的な組換えタンパク質発現技術で調製することができる。この目的のために、本発明による1つまたは複数のタンパク質あるいはそのようなタンパク質のマルチマーをコードするヌクレオチド配列が発現ベクターに挿入される。好ましくは、ヌクレオチド配列は、配列番号1または配列番号14に示されるヌクレオチド配列あるいはこのような配列の1つまたは複数のフラグメントを含むヌクレオチド配列である。本発明によるヌクレオチド配列の好ましいフラグメントは、配列番号1に示される配列のヌクレオチドフラグメント1222～5076、2068～5076、2068～3594、1222～2067、2068～2280、2281～3594、3595～3690、3691～5076であり、その組み合わせ(例えば、フラグメント1222～2067とフラグメント2281～3594との組み合わせなど)である。本発明によるさらに好ましいフラグメントは、配列番号15に示されるヌクレオチド配列のフラグメントであり、例えば、配列番号1のヌクレオチド3595～3690によって示されるヌクレオチド配列である。同様に好適なものは、配列番号1または配列番号14の配列に、あるいは配列番号1または配列番号14に示される配列との配列相同性が少なくとも70%、好ましくは80%であり、より好ましくは90%であるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列である。DNAプラスミドにおける使用に好適なヌクレオチド配列同士の配列相同性は、以前に記載されているように決定される。

【0024】

好適な発現ベクターは、特に、複製および発現に必要な制御領域を含むプラスミド、コスミド、ウイルスおよびYAC(酵母人工染色体)である。発現ベクターは宿主細胞における発現をもたらし得る。好適な宿主細胞は、例えば、細菌細胞、酵母細胞および哺乳動物細胞である。そのような発現技術は、当分野では周知である(Sambrooke他、Molecular Cloning: a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、1989)。発現したタンパク質は培地から単離して精製することができる。p130の全ORF(配列番号1のヌクレオチドフラグメント997～5076)の発現は、構造タンパク質の自発的な集合によるウイルス様粒子を生成させることができる。

【0025】

本発明はさらに、1つまたは複数の構造PDタンパク質および薬学的に許容可能なキャリアを含むワクチンを提供する。より詳細には、本発明によるワクチンは、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するキャプシドタンパク質またはその誘導体、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有するE3タンパク質またはその誘導体、配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するE2タンパク質またはその誘導体、配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するE1タンパク質またはその誘導体、配列番号7または配列番号15に示されるアミノ酸配列を有する6Kタンパク質またはその誘導体、あるいは本発明による1つまたは複数のタンパク質を含む混合物を含む。好ましくは、本発明によるワクチンはE2タンパク質を含み、キャプシドタンパク質を必要に応じて含む。同様に好ましいものは、PDのすべての構造タンパク質を含むワクチンである。これらのタンパク質はウイルス様粒子を自発的に形成することができ、従って、病原体全体のワクチンに非常に類似するワクチンを提供する。本発明によるワクチンは、ワクチン接種と野外におけるPDによる感染とを区別するマーカーワクチンとしての使用に好適である。本発明による好ましいワクチンは

10

20

30

40

50

、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有する6Kタンパク質を含むマーカークワチンである。

【0026】

本発明によるワクチンは、当業者に周知の技術に従って調製することができる。DNAワクチンを調製するための一般的な技術は広く記載されており、例えば、欧州特許第0773295号および米国特許第5580859号に記載されている。

【0027】

本発明によるワクチンは、有効量の上記のDNAプラスミド、ベクター細菌またはベクターウイルスあるいはタンパク質、および薬学的に許容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用されている用語「有効」は、標的の魚における免疫応答を誘導するのに十分な量として定義される。プラスミド、ベクターまたはタンパク質の量は、プラスミドまたはベクターのタイプ、投与経路、投与時期、魚の種、ならびに年齢、全身の健康状態および餌に依存する。

10

【0028】

一般に、体重1kgあたり0.01 μ g~1000 μ gのタンパク質、好ましくは0.5 μ g~500 μ gのタンパク質、より好ましくは0.1 μ g~100 μ gのタンパク質の投与量を使用することができる。DNAワクチンの場合、一般に、10pgの最少投薬量から1000 μ gの投薬量までのプラスミドが、インビボでの抗原の好適な発現に十分であると記載されている。

【0029】

本発明によるワクチンにおける使用に好適な薬学的に許容可能なキャリアは、無菌の水、生理食塩水、PBSなどの水性緩衝液などである。さらに、本発明によるワクチンは、アジュバント、安定化剤、抗酸化剤などの他の添加剤を含むことができる。

20

【0030】

好適なアジュバントには、特に、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、アンフィゲン(amphigen)、トコフェノール類、モノホスフェニルリピドA、ムラミルジペプチド、油性エマルジョン、グルカン、カルボマー、ブロックコポリマー、サイトカイン、およびキル(Quil)Aなどのサポニンが含まれる。添加されるアジュバントの量は、アジュバント自体の性質に依存する。

【0031】

本発明によるワクチンにおける使用に好適な安定化剤は、例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、デキストリンおよびグルコースなどの炭水化物、アルブミンまたはカゼインなどのタンパク質、アルカリ性リン酸塩のような緩衝剤である。

30

【0032】

本発明によるワクチンは、注射、スプレー、浸漬によって、または経口的に魚に投与される。投与プロトコルは、標準的なワクチン接種実施に従って最適化することができる。

【0033】

本発明によるヌクレオチド配列およびタンパク質はまた、診断における使用に好適である。ヌクレオチド配列またはそのフラグメントは、魚におけるPDウイルスの存在を検出するために使用することができる。E2のC末端部/6K/E1のN末端部に広がるプライマー(図2参照)をRT-PCRに使用して、PD発生の臨床的標本におけるPDウイルスの存在が十分に検出された。タンパク質は、魚における抗体の存在を検出するために使用することができる。

40

【0034】

本発明によるタンパク質は、さらに、当業者に利用可能な一般的な技術を使用して、抗体を産生させるために使用することができる。好ましくは、タンパク質は、特異的なモノクローナル抗体を産生させるために使用される。得られる抗体は、野外または魚におけるPDウイルスを検出するために、診断において利用することができる。

【0035】

従って、別の局面において、本発明は、本発明による1つまたは複数のヌクレオチド配列

50

、あるいは本発明による1つまたは複数の構造タンパク質、あるいはそのようなタンパク質を用いて得られる抗体を含む診断キットを提供する。本発明による抗体は標準的な技術に従って調製することができる。タンパク質を用いた動物(例えば、マウス)の免疫化手順、および免疫原に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選抜は当分野で周知である(例えば、Coligan他(編)、Current protocols in Immunology、1992; KohlerおよびMilstein、Nature、256:495~497、1975; Steenbakkers他、Mol. Biol. Rep. 19:125~134、1994を参照のこと)。

【0036】

下記の実施例は本発明を例示するものであり、いかなる点においても本発明を限定するように解釈してはならない。

【0037】

図面

図1は、PDの構造タンパク質をコードする様々なクローン化されたヌクレオチド配列の構造的配置を示す;

図2は、E2遺伝子C末端/「長型」6K遺伝子/E1遺伝子N末端のヌクレオチド配列を示す。E2/6Kタンパク質と6K/E1タンパク質との間の予想される切断部位を垂直線(|)により示す。「長型」6Kタンパク質をコードするヌクレオチド配列は204ヌクレオチドの長さであり、68アミノ酸のタンパク質をコードする。配列の右側にある括弧内の数字は、それぞれ、6K遺伝子または6Kタンパク質のヌクレオチド残基およびアミノ酸残基を示す。6K遺伝子をコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド位44において、G残基がA残基と置換されていることがある。その結果、図に示されるアミノ酸配列のアミノ酸位15において、N残基を有する6Kタンパク質が生じる。

【0038】

実施例

細胞およびウイルス

サケPDウイルス(SPDV)株の単離および培養を、一般には欧州特許出願公開EP-A-712926に記載されているように行った。SPDVのF913125単離体を、以前の記載(R.T. Nelson他、(1995)、脾臓病に罹った養殖大西洋サケSalmo salarからのトガ様ウイルスの単離、Diseases of Aquatic Organisms、22、25頁~32頁)に従ってChinookサケ胚(CHSE-214)細胞で増殖させた。ウイルスを精製するために、75cm²フラスコで約80%の周密にまで増殖させたCHSE-214の単層培養物を1mlウイルスで感染させ、約1の感染多重度が得られた。1時間吸着させた後、さらなる14mlの補充したイーグル最少必須培地(MEM)を各フラスコに入れた。ウイルス感染させたフラスコを、ウイルス誘導の細胞変性作用が明らかになる7~8日間、15℃でインキュベーションして、上清を集めた。

【0039】

ウイルス精製

上清(典型的には、ウイルス感染細胞から得られた500ml)を3000gで20分間清澄化した。ポリエチレングリコール(PEG)およびNaClを加え、最終濃度を、それぞれ、6%および2.2%にした。4℃で一晩インキュベーションした後、PEG沈殿物を3000gで2時間の遠心分離により集めた。得られたペレットをPBS(1~2ml)に再懸濁し、1000gで5分間清澄化した後、粗ウイルス懸濁物を、スクロースの11mlの勾配物(PBSでの20~60w/w%)を使用する平衡密度遠心分離によって分画化した。4℃において75000gで18時間遠心分離した後、1mlの画分を勾配物の底から回収した。ウイルスを含有する画分を、PDに特異的なマウスモノクローナル抗体(Weilsh他、投稿中、1999)を使用する免疫プロットングによって同定した。

【0040】

PDウイルスcDNAクローンの作製

ウイルスのRNAを、勾配精製したPDウイルスおよびウイルス感染細胞から、RNA抽出器(Genosys)を使用して抽出し、エタノール沈殿物として保存した。cDNAライブラリーを、勾配精製したウイルスから抽出されたRNAを用いてランダムプライマー法によって作製した。このライブラリーは、ベクターpUC18(Sureclone連結キット、Pharmacia)に挿入物(250~500bp)を含有するクローンからなった。クローンを無作為にライブラリーから選び、配列決定およびBLASTプログラム(ウイスコンシン大学、Genetics Computer Group)を使用する分析を行った後、アルファウイルスゲノムに対してマッピングした。N11、N38およびN50の3クローンの配列を使用して、PDゲノムの3'末端の5.2kb領域を含む3つの重複フラグメントを増幅する逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。NotI部位をプライマーに取り込むことによって、これらのフラグメントの2つをベクターpBluescript(Stratagene)のNotI部位への制限連結が容易になった。PCRを、Expand Long Template PCRシステム(Boehringer Mannheim)を使用して、94 で30秒間、60 で30秒間、68 で2分間行った。別のクローンを3'RACE(M.A.Frohmann他、1998; 単一遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用する希な転写物からの全長cDNAの迅速な作製、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、85、8998頁~9002頁)を使用して作製した。反応を、5'/3'RACEキット(Boehringer Mannheim)を若干の改変とともに使用して行った。このようにして、勾配精製ウイルスから得られたRNAを最初の鎖の合成に独立的に供し、得られたcDNAを、94 で30秒間、60 で30秒間、68 で1分間のPCRによって増幅した。

【0041】

PDウイルスcDNAクローンの配列決定

サイクル配列決定を、精製されたプラスミドDNAについて、製造者(Perkin Elmer Cetus)のプロトコルに従ってABI PRISM色素ターミネーター調製反応キットを使用して行った。エレクトロフォレトグラムを、Sequence Navigatorソフトウェア(Perkin Elmer Cetus)を使用して解読した。PDウイルスRNAの3'末端の5.2kb領域の完全なヌクレオチド配列を配列番号1に示す。

【0042】

PD感染した膵臓組織から直接抽出されたウイルスRNAに対するE2のC末端およびE1のN末端に隣接するプライマーを使用するRT-PCRおよび配列分析によって、配列番号1のヌクレオチド3595~3690により示されるヌクレオチド配列よりも長い6Kをコードするヌクレオチド配列が明らかにされた。全長の6Kタンパク質をコードする核酸ならびに推定アミノ酸配列を図2に示す。

【0043】

SPDVのpFastBac1構築物およびpcDNA3.1(+)構築物

標準的なクローニング技術(Sambrooke他、Molecular Cloning: a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、1989)を使用して、SPDVの構造領域を示す4クローンを、バキュロウイルスシステムで発現させるためにpFastBac1(Gibco BRL)において作製した。これらのクローンはまた、モノクローナル抗体の特徴づけのために、そしてDNAワクチンとして使用するために発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen)において作製された。

【0044】

クローン1

p130は、キャプシドタンパク質の最初のATGからポリ(A)テールまでの完全な構

10

20

30

40

50

造遺伝子領域をコードする(3944 nt)。cDNAを、下記のプライマーを使用して、RT-PCRによってウイルスRNAから作製した：

5' 順方向プライマー(5' 130 Not I)：5' - TGC ATG CGG CCG
CAT GTT TCC CAT GCA ATT CAC CAA C - 3' (配列
番号9)

3' 逆方向プライマー(3' 130 Not I) (配列5' から3')：5' - TGC A
TG CGG CCG CTT GTA TTG AAA ATT TTA AAA C
CA A - 3' (配列番号10)。

【0045】

これらのプライマーは、(制限酵素の認識を確実にする)5ヌクレオチドの領域、その後のNot I部位、次いで適切なSPDV配列(示した配列の強調部、5' 130 Not Iについては1222~1245および3' 130 Not Iについては5143~5166)を含有する。3944 ntのcDNA産物をpFastBac1およびpcDNA3.1の両方のNot I部位にクローン化した。

【0046】

クローン2

p98は、E3、E2、6KおよびE1からポリ(A)テールまでをコードする(3098 nt)。cDNAを、下記のプライマーを使用して、RT-PCRによってウイルスRNAから作製した：

5' 順方向プライマー(5' E3 Not I)：5' - TGC ATG CGG CCG
CAT GAC ACG CGC TCC GGC CCT CCT G - 3' (配列番
号11)

3' 逆方向プライマー(3' 130 Not I)：5' - TGC ATG CGG CCG
CTT GTA TTG AAA ATT TTA AAA CCA A - 3' (配列
番号10)。

【0047】

プライマー5' E3 Not Iは、(制限酵素の認識を確実にする)5ヌクレオチドの領域、その後のNot I部位、ATG(人工的な開始コドン)、次いで適切なSPDV配列(2067~2088)を含有する。プライマー3' 130 Not Iは、クローン1において上記に記載されている通りである。3098 ntのcDNA産物をpFastBac1およびpcDNA3.1の両方のNot I部位にクローン化した。

【0048】

クローン3

pE2は、E3およびE2の糖タンパク質をコードする(1527 nt)。cDNAを、下記のプライマーを使用して、RT-PCRによってウイルスRNAから作製した：

5' 順方向プライマー(5' E3 Not I)：5' - TGC ATG CGG CCG
CAT GAC ACG CGC TCC GGC CCT CCT G - 3' (配列番
号11)

3' 逆方向プライマー(3' E2 Not I)：5' - TGC ATG CGG CCG
CTC ACG CGC GAG CCC CTG GTA TGC AAC A - 3'
(配列番号12)。

【0049】

プライマー5' E3 Not Iは、クローン2において上記に記載されている通りである。プライマー3' E2 Not Iは、(制限酵素の認識を確実にする)5ヌクレオチドの領域、その後のNot I部位、TGA(人工的な終止コドン)、次いで適切なSPDV配列(示した配列の強調部、3571~3594)を含有する。1527 ntのcDNA産物をpFastBac1およびpcDNA3.1の両方のNot I部位にクローン化した。

【0050】

クローン4

E2は、E2糖タンパク質をコードする(1314 nt)。cDNAを、下記のプライマ

10

20

30

40

50

ーを使用して、RT-PCRによってウイルスRNAから作製した：

5'順方向プライマー(5'E2NotI)：5'-TGC ATG CGG CCG
CAT GGC TGT GTC TAC GTC GCC TGC C-3'(配列番
号13)

3'逆方向プライマー(3'E2NotI)：5'-TGC ATG CGG CCG
CTC ACG CGC GAG CCC CTG GTA TGC AAC A-3'
(配列番号12)。

【0051】

プライマー5'E2NotIは、(制限酵素の認識を確実にする)5ヌクレオチドの領域、その後のNotI部位、ATG(人工的な開始コドン)、次いで適切なSPDV配列(2281~2301)を含有する。プライマー3'E2NotIは、クローン3において上記に記載されている通りである。1314ntのcDNA産物をpFastBac1およびpcDNA3.1の両方のNotI部位にクローン化した。

10

【0052】

昆虫細胞(SF-9)に4つの組換えバキュロウイルス構築物を感染させた。不活化PDウイルス全体に対して惹起させたモノクローナル抗体を使用して、IFIT染色をこれらの組換えバキュロウイルス感染SF-9細胞に対して行った。すべての産生タンパク質がモノクローナル抗体と陽性に反応し、このことは、組換えタンパク質が野生型エピトープを有していることを示している。

【0053】

抗原投与実験

4つの構築物のすべてによって産生されたタンパク質を、Triton抽出を使用して回収した。タンパク質を、生きている組換えバキュロウイルスが環境に伝搬する可能性を防止するためにBPL不活化処理した。タンパク質を油中水型ワクチン配合物に配合して、0.2mlのワクチン容量で注射した。

20

【0054】

抗PD-E2モノクローナル(2D9捕獲および7A2)を使用するELISA分析によって、投与組換えワクチンあたりの反応性エピトープの量は、従来の不活化PDウイルスワクチンの用量で見出されるエピトープ量に匹敵するか、またはさらに多いことが明らかにされた。

30

【0055】

大西洋サケにおいてワクチン接種後の8週目に行われた標準化抗原投与実験によって、サケPDウイルスによる抗原投与からの保護がこれらの組換えサブユニットワクチンで得ることができることが示された。実験において、腓臓、骨格筋および心筋における傷害を通常の方法で評価した。有意水準をKruskal-Wallisの一元分散分析(非母数検定)により計算した。E2タンパク質またはE2-E3タンパク質を含むワクチン配合物は、不活化PDウイルスワクチンで得られるのと類似する保護レベルをもたらしたが、p130構築物およびp98構築物から、それぞれ、得られる組換えタンパク質を含むワクチンは、不活化PDウイルスワクチンよりも低い保護レベルであった。

【0056】

抗体の作製

p130ヌクレオチド構築物の発現から得られるタンパク質を用いたDNAワクチン接種を、組換えタンパク質の抗原性を調べるためにマウスで行った。p130-pcDNA3.1組換え発現プラスミド(クローン1を参照のこと)を用いた2回の筋肉内接種後、マウスの血清は、インビトロで得られたPDウイルスとの抗体反応を示した。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 PDの構造タンパク質をコードする様々なクローン化されたヌクレオチド配列の構造的配置を示す。

【図2】 E2遺伝子C末端/「長型」6K遺伝子/E1遺伝子N末端のヌクレオチド配列を示す。

50

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

5 (i) APPLICANT:

(A) NAME: Akzo Nobel NV

(B) STREET: Velperweg 76

(C) CITY: Arnhem

10 (E) COUNTRY: The netherlands

(F) POSTAL CODE (ZIP): 6824 BM

(G) TELEPHONE: 0412 666379

(H) TELEFAX: 0412 650592 10

15 (ii) TITLE OF INVENTION: Structural Proteins of Fish Pancreatic
Disease Virus and Uses Thereof

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 15

20 (iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO) 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1: 20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

30 (A) LENGTH: 5179 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35 (ii) MOLECULE TYPE: RNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

40 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Salmon pancreatic disease virus 30

(B) STRAIN: ..

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: ..

45 (F) TISSUE TYPE: ..

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: ..

(B) CLONE: ..

50 (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 2..1186

(D) OTHER INFORMATION: /partial
/product= "NSP4 (C-terminal region) "

5 (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 997..5076
(D) OTHER INFORMATION: /product= "p130"

10 (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 1222..2067
(D) OTHER INFORMATION: /product= "Capsid"

15 (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 2068..2280
(D) OTHER INFORMATION: /product= "E3"

10

20 (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 2281..3594
(D) OTHER INFORMATION: /product= "E2"

25 (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 3595..3690
(D) OTHER INFORMATION: /product= "6K"

20

30 (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 3691..5076
(D) OTHER INFORMATION: /product= "E1"

35

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

GACTATGGAC TCAGCGGCAA TGAACGTGGA GGCTTTTAAA AGTTTCGCCT GTAAGGACAC 60
40 CGACCTGTGG ACTGAGTTCG CGGAAAAACC AGTAAGGTTG TCGCCCGGCC AAATCGAAGA 120
GTATGTCTTT CATCTACAAG GGGCCAAGGC CAATGTGATG CACAGCAGAG TCGAAGCCGT 180
45 ATGCCCTGAC CTCTCGGAGG TGGCTATGGA CAGGTTTACA CTAGACATGA AACGCGACGT 240
CAAAGTGACG CCAGGCACGA AGCACGTAGA GGAGAGACCT AAAGTCCAAG AGATTCAAGC 300
GGCCGACCCC ATGGCCACCG CGTACTTGTG CGCCATCCAT AGAGAGCTAG TCCGAAGGCT 360
50 GAAGGCCGTC CTGAAACCGT CTATACACGT GTTGTTCGAT ATGAGCTCCG AGGATTTTGA 420
TGCTATCGTG GGCCATGGGA TGAAGTTGGG TGACAAGGTG CTGGAAACGG ACATCTCCTC 480
55 ATTCGACAAG AGCCAGGACC AAGCCATGSC GGTIACAGCG CTGATGCTGC TGAGGGACTT 540

30

	CGT GTT CAG AAG AAC AAG CAG AAG AAG AAG AAC TCT TCC AAC GGA GAA	1494	
	Arg Val Gln Lys Asn Lys Gln Lys Lys Lys Asn Ser Ser Asn Gly Glu		
	155 160 165		
5	AAA CCC AAA GAG AAG AAG AAG AAG CAA AAA CAA CAG GAG AAG AAG GGA	1542	
	Lys Pro Lys Lys Glu Lys Lys Lys Lys Gln Lys Gln Gln Glu Lys Lys Gly		
	170 175 180		
10	AGC GGT GGC GAA AAA GTC AAG AAG ACT AGG AAC CGA CCC GGG AAG GAG	1590	
	Ser Gly Gly Glu Lys Val Lys Lys Thr Arg Asn Arg Pro Gly Lys Glu		
	185 190 195		
15	GTA AGG ATC TCC GTA AAG TGT GCC CGA CAG AGC ACC TTC CCC GTG TAC	1638	
	Val Arg Ile Ser Val Lys Cys Ala Arg Gln Ser Thr Phe Pro Val Tyr		10
	200 205 210		
20	CAC GAA GGT GCT ATA TCC GGC TAC GCT GTG CTG ATT GGA TCT CGC GTA	1686	
	His Glu Gly Ala Ile Ser Gly Tyr Ala Val Leu Ile Gly Ser Arg Val		
	215 220 225 230		
	TTC AAG CCG GCA CAC GTG AAG GGT AAG ATC GAC CAC CCT GAA CTG GCA	1734	
	Phe Lys Pro Ala His Val Lys Gly Lys Ile Asp His Pro Glu Leu Ala		
	235 240 245		
25	GAC ATC AAG TTC CAG GTC GCC GAG GAC ATG GAC CTC GAA GCA GCT GCG	1782	
	Asp Ile Lys Phe Gln Val Ala Glu Asp Met Asp Leu Glu Ala Ala Ala		
	250 255 260		
30	TAC CCG AAG AGC ATG CGA GAC CAA GCG GCT GAA CCA GCG ACC ATG ATG	1830	
	Tyr Pro Lys Ser Met Arg Asp Gln Ala Ala Glu Pro Ala Thr Met Met		20
	265 270 275		
35	GAC AGA GTG TAC AAC TGG GAG TAT GGC ACT ATC AGA GTG GAG GAT AAT	1878	
	Asp Arg Val Tyr Asn Trp Glu Tyr Gly Thr Ile Arg Val Glu Asp Asn		
	280 285 290		
40	GTC ATA ATC GAC GCA AGC GGT AGG GGC AAG CCG GGT GAC AGT GGC AGG	1926	
	Val Ile Ile Asp Ala Ser Gly Arg Gly Lys Pro Gly Asp Ser Gly Arg		
	295 300 305 310		
	GCC ATC ACC GAC AAC TCG GGA AAG GTT GTT GGT ATT GTC CTC GGA GGA	1974	
	Ala Ile Thr Asp Asn Ser Gly Lys Val Val Gly Ile Val Leu Gly Gly		
	315 320 325		30
45	GGA CCC GAT GGC AGG CGC ACA CGC CTC TCC GTG ATA GGT TTC GAC AAG	2022	
	Gly Pro Asp Gly Arg Arg Thr Arg Leu Ser Val Ile Gly Phe Asp Lys		
	330 335 340		
50	AAG ATG AAG GCT AGG GAG ATC GCC TAC AGT GAT GCC ATA CCT TGG ACA	2070	
	Lys Met Lys Ala Arg Glu Ile Ala Tyr Ser Asp Ala Ile Pro Trp Thr		
	345 350 355		
55	CGC GCT CCG GCC CTC CTG CTG CTG CCT ATG GTT ATT GTC TGC ACC TAC	2118	
	Arg Ala Pro Ala Leu Leu Leu Leu Pro Met Val Ile Val Cys Thr Tyr		
	360 365 370		

	AAT TCC AAC ACC TTC GAT TGC TCC AAA CCG TCC TGC CAG GAC TGC TGC	2166	
	Asn Ser Asn Thr Phe Asp Cys Ser Lys Pro Ser Cys Gln Asp Cys Cys		
	375 380 385 390		
5	ATT ACT GCT GAA CCA GAG AAG GCC ATG ACC ATG CTG AAG GAC AAT CTG	2214	
	Ile Thr Ala Glu Pro Glu Lys Ala Met Thr Met Leu Lys Asp Asn Leu		
	395 400 405		
10	AAC GAC CCG AAC TAC TGG GAC CTA CTC ATT GCT GTC ACC ACC TGT GGC	2262	
	Asn Asp Pro Asn Tyr Trp Asp Leu Leu Ile Ala Val Thr Thr Cys Gly		
	410 415 420		
15	TCC GCC CGG AGA AAG AGG GCT GTG TCT ACG TCG CCT GCC GCC TTT TAC	2310	
	Ser Ala Arg Arg Lys Arg Ala Val Ser Thr Ser Pro Ala Ala Phe Tyr		10
	425 430 435		
20	GAC ACA CAG ATC CTC GCC GCC CAC GCA GCT GCC TCC CCA TAC AGG GCG	2358	
	Asp Thr Gln Ile Leu Ala Ala His Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Arg Ala		
	440 445 450		
25	TAC TGC CCC GAT TGT GAC GGA ACA GCG TGT ATC TCG CCG ATA GCC ATC	2406	
	Tyr Cys Pro Asp Cys Asp Gly Thr Ala Cys Ile Ser Pro Ile Ala Ile		
	455 460 465 470		
30	GAC GAG GTG GTG AGC AGT GGC AGC GAC CAC GTC CTC CGC ATG CGG GTT	2454	
	Asp Glu Val Val Ser Ser Gly Ser Asp His Val Leu Arg Met Arg Val		
	475 480 485		
35	GGT TCT CAA TCG GGA GTG ACC GCT AAG GGT GGT GCG GCG GGT GAG ACC	2502	20
	Gly Ser Gln Ser Gly Val Thr Ala Lys Gly Gly Ala Ala Gly Glu Thr		
	490 495 500		
40	TCT CTG CGA TAC CTG GGA AGG GAC GGG AAG GTT CAC GCC GCA GAC AAC	2550	
	Ser Leu Arg Tyr Leu Gly Arg Asp Gly Lys Val His Ala Ala Asp Asn		
	505 510 515		
45	ACG CGA CTC GTG GTG CGC ACG ACT GCA AAG TGC GAC GTG CTG CAG GCC	2598	
	Thr Arg Leu Val Val Arg Thr Thr Ala Lys Cys Asp Val Leu Gln Ala		
	520 525 530		
50	ACT GGC CAC TAC ATC CTG GCC AAC TGC CCA GTG GGG CAG AGC CTA ACC	2646	
	Thr Gly His Tyr Ile Leu Ala Asn Cys Pro Val Gly Gln Ser Leu Thr		
	535 540 545 550		
55	GTT GCG GCC ACA CTG GAT GGC ACC CGG CAT CAA TGC ACC ACG GTT TTC	2694	30
	Val Ala Ala Thr Leu Asp Gly Thr Arg His Gln Cys Thr Thr Val Phe		
	555 560 565		
55	GAA CAC CAA GTA ACG GAG AAG TTC ACC AGA GAA CGC AGC AAG GGC CAC	2742	
	Glu His Gln Val Thr Glu Lys Phe Thr Arg Glu Arg Ser Lys Gly His		
	570 575 580		
55	CAT CTG TCC GAC ATG ACC AAG AAA TGC ACC AGA TTT TCC ACT ACA CCA	2790	
	His Leu Ser Asp Met Thr Lys Lys Cys Thr Arg Phe Ser Thr Thr Pro		

Pro Glu Tyr Ala Trp Ala Phe Val Gly Val Ala Cys Gly Leu Leu Ala
810 815 820

5 ATC GCA GCG TGC ATG TTT GCG TGC GCA TGC AGC AGG GTG CGG TAC TCT 3510
Ile Ala Ala Cys Met Phe Ala Cys Ala Cys Ser Arg Val Arg Tyr Ser
825 830 835

10 CTG GTC GCC AAC ACG TTC AAC TCG AAC CCA CCA CCA TTG ACC GCA CTG 3558
Leu Val Ala Asn Thr Phe Asn Ser Asn Pro Pro Pro Leu Thr Ala Leu
840 845 850

15 ACT GCA GCA CTG TGT TGC ATA CCA GGG GCT CGC GCG GAC CAA CCC TAC 3606
Thr Ala Ala Leu Cys Cys Ile Pro Gly Ala Arg Ala Asp Gln Pro Tyr
855 860 865 870

20 TTG GAC ATC ATT GCC TAC TTT TTA GGG GTA AGA GGG TGG TCA GCC CTG 3654
Leu Asp Ile Ile Ala Tyr Phe Leu Gly Val Arg Gly Trp Ser Ala Leu
875 880 885

25 CTG GTC ATC CTT GCG TAT GTA CAG AGC TGC AAG AGC TAC GAA CAC ACC 3702
Leu Val Ile Leu Ala Tyr Val Gln Ser Cys Lys Ser Tyr Glu His Thr
890 895 900

30 GTG GTG GTC CCA ATG GAT CCA AGA GCC CCG TCG TAC GAA GCA GTG ATA 3750
Val Val Val Pro Met Asp Pro Arg Ala Pro Ser Tyr Glu Ala Val Ile
905 910 915

35 AAC CGG AAT GGG TAT GAT CCA TTG AAG CTG ACC ATC TCA GTG AAT TTC 3798
Asn Arg Asn Gly Tyr Asp Pro Leu Lys Leu Thr Ile Ser Val Asn Phe
920 925 930

40 ACC GTC ATC TCA CCA ACT ACG GCT CTG GAA TAT TGG ACC TGC GCA GGA 3846
Thr Val Ile Ser Pro Thr Thr Ala Leu Glu Tyr Trp Thr Cys Ala Gly
935 940 945 950

45 GTC CCC ATC GTC GAG CCG CCC CAT GTG GGC TGC TGC ACG TCG GTG TCC 3894
Val Pro Ile Val Glu Pro Pro His Val Gly Cys Cys Thr Ser Val Ser
955 960 965

50 TGC CCC TCT GAC CTC TCT ACG CTG CAT GCG TTT ACT GGC AAA GCT GTC 3942
Cys Pro Ser Asp Leu Ser Thr Leu His Ala Phe Thr Gly Lys Ala Val
970 975 980

55 TCC GAC GTG CAC TGC GAT GTG CAC ACA AAC GTG TAC CCC TTG TTG TGG 3990
Ser Asp Val His Cys Asp Val His Thr Asn Val Tyr Pro Leu Leu Trp
985 990 995

GGC GCG GCT CAC TGC TTC TGT TCC ACC GAG AAT ACA CAG GTC AGC GCT 4038
Gly Ala Ala His Cys Phe Cys Ser Thr Glu Asn Thr Gln Val Ser Ala
1000 1005 1010

GTG GCA GCC ACC GTT TCT GAG TTC TGT GCC CAG GAC TCA GAG CCT GCC 4086
Val Ala Ala Thr Val Ser Glu Phe Cys Ala Gln Asp Ser Glu Arg Ala
1015 1020 1025 1030

10

20

30

GAA GCG TTC AGC GTA CAC AGC AGC TCA GTC ACC GCT GAG GTC CTG GTG 4134
 Glu Ala Phe Ser Val His Ser Ser Ser Val Thr Ala Glu Val Leu Val
 1035 1040 1045

5 ACG CTT GGT GAA GTG GTG ACG GCA GTC CAC GTT TAC GTG GAC GGG GTA 4182
 Thr Leu Gly Glu Val Val Thr Ala Val His Val Tyr Val Asp Gly Val
 1050 1055 1060

10 ACA TCA GCC AGG GGC ACT GAC CTC AAG ATC GTG GCT GGA CCA ATA ACA 4230
 Thr Ser Ala Arg Gly Thr Asp Leu Lys Ile Val Ala Gly Pro Ile Thr
 1065 1070 1075

15 ACC GAC TAC TCC CCA TTC GAT CGC AAA GTA GTC CGC ATC GGC GAA GAG 4278
 Thr Asp Tyr Ser Pro Phe Asp Arg Lys Val Val Arg Ile Gly Glu Glu
 1080 1085 1090

20 GTC TAT AAC TAT GAC TGG CCT CCT TAC GGG GCT GGC CGA CCA GGC ACA 4326
 Val Tyr Asn Tyr Asp Trp Pro Pro Tyr Gly Ala Gly Arg Pro Gly Thr
 1095 1100 1105 1110

TTC GGA GAC ATT CAA GCT AGG TCA ACC AAC TAT GTC AAA CCC AAC GAT 4374
 Phe Gly Asp Ile Gln Ala Arg Ser Thr Asn Tyr Val Lys Pro Asn Asp
 1115 1120 1125

25 CTG TAT GGG GAC ATC GGA ATT GAA GTA CTG CAG CCG ACT AAC GAC CAC 4422
 Leu Tyr Gly Asp Ile Gly Ile Glu Val Leu Gln Pro Thr Asn Asp His
 1130 1135 1140

30 GTA CAT GTG GCT TAC ACG TAT ACG ACC TCT GGG TTA CTG CGT TGG CTG 4470
 Val His Val Ala Tyr Thr Tyr Thr Thr Ser Gly Leu Leu Arg Trp Leu
 1145 1150 1155

35 CAG GAC GCT CCG AAA CCA CTC AGT GTC ACA GCA CCG CAC GGT TGT AAG 4518
 Gln Asp Ala Pro Lys Pro Leu Ser Val Thr Ala Pro His Gly Cys Lys
 1160 1165 1170

40 ATC AGT GCC AAT CCG CTC CTG GCC CTC GAT TGT GGG GTT GGT GCC GTC 4566
 Ile Ser Ala Asn Pro Leu Leu Ala Leu Asp Cys Gly Val Gly Ala Val
 1175 1180 1185 1190

10

20

CCC ATG TCC ATC AAC ATT CCG GAC GCG AAG TTT ACC CGC AAA TTA AAG 4614
 Pro Met Ser Ile Asn Ile Pro Asp Ala Lys Phe Thr Arg Lys Leu Lys
 1195 1200 1205

5 GAT CCG AAA CCA TCG GCC CTG AAA TGC GTG GTG GAC AGC TGC GAG TAC 4662
 Asp Pro Lys Pro Ser Ala Leu Lys Cys Val Val Asp Ser Cys Glu Tyr
 1210 1215 1220

10 GGG GTG GAC TAC GGG GGC GCC GCC ACG ATC ACC TAC GAG GGC CAC GAG 4710
 Gly Val Asp Tyr Gly Gly Ala Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly His Glu
 1225 1230 1235

15 GCC GGG AAG TGC GGG ATT CAT TCC CTG ACA CCA GGA GTC CCC CTG AGA 4758
 Ala Gly Lys Cys Gly Ile His Ser Leu Thr Pro Gly Val Pro Leu Arg
 1240 1245 1250

20 ACA TCG GTG GTT GAA GTG GTT GCT GGC GCC AAT ACC GTC AAA ACG ACC 4806
 Thr Ser Val Val Glu Val Val Ala Gly Ala Asn Thr Val Lys Thr Thr
 1255 1260 1265 1270

TTC TCC TCA CCC ACG CCC GAG GTT GCA CTC GAG GTA GAG ATC TGT TCG 4854
 Phe Ser Ser Pro Thr Pro Glu Val Ala Leu Glu Val Glu Ile Cys Ser
 1275 1280 1285

25 GCA ATA GTG AAG TGC GCT GGT GAG TGC ACT CCA CCG AAG GAA CAT GTG 4902
 Ala Ile Val Lys Cys Ala Gly Glu Cys Thr Pro Pro Lys Glu His Val
 1290 1295 1300

30 GTC GCA ACC AGG CCT CGC CAT GGC AGC GAC CCT GGA GGC TAC ATC TCC 4950
 Val Ala Thr Arg Pro Arg His Gly Ser Asp Pro Gly Gly Tyr Ile Ser
 1305 1310 1315

35 GGG CCC GCA ATG CGC TGG GCC GGA GGG ATT GTA GGG ACC CTA GTG GTC 4998
 Gly Pro Ala Met Arg Trp Ala Gly Gly Ile Val Gly Thr Leu Val Val
 1320 1325 1330

40 CTG TTC CTT ATC CTT GCC GTC ATC TAC TGC GTG GTG AAG AAG TGC CGC 5046
 Leu Phe Leu Ile Leu Ala Val Ile Tyr Cys Val Val Lys Lys Cys Arg
 1335 1340 1345 1350

45 TCC AAA AGA ATC CGG ATA GTC AAG AGC TAAATTCCCG TATACAAATT 5093
 Ser Lys Arg Ile Arg Ile Val Lys Ser
 1355

50 GCTCACTAGG AGCCCATCCG ATCCACAGG GAGTAGGATG AGTCATCTAT TGGTTTAAA5153
 ATTTTCAATA CAAAAAAAAA AAAAAA 5179

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 394 amino acids
 (B) TYPE: amino acid

55

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

5 (ix) FEATURE:
 (D) OTHER INFORMATION: /label= "NSP4"

10 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

10	Thr	Met	Asp	Ser	Ala	Ala	Met	Asn	Val	Glu	Ala	Phe	Lys	Ser	Phe	Ala	
	1				5					10					15		
	Cys	Lys	Asp	Thr	Asp	Leu	Trp	Thr	Glu	Phe	Ala	Glu	Lys	Pro	Val	Arg	10
15				20					25					30			
	Leu	Ser	Pro	Gly	Gln	Ile	Glu	Glu	Tyr	Val	Phe	His	Leu	Gln	Gly	Ala	
			35				40						45				
20	Lys	Ala	Asn	Val	Met	His	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Val	Cys	Pro	Asp	Leu	
		50					55						60				
	Ser	Glu	Val	Ala	Met	Asp	Arg	Phe	Thr	Leu	Asp	Met	Lys	Arg	Asp	Val	
25		65				70				75					80		
	Lys	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Lys	His	Val	Glu	Glu	Arg	Pro	Lys	Val	Gln	
					85					90					95		
30	Glu	Ile	Gln	Ala	Ala	Asp	Pro	Met	Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ile	20
				100					105					110			
	His	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Ala	Val	Leu	Lys	Pro	Ser	Ile	
				115				120					125				
35	His	Val	Leu	Phe	Asp	Met	Ser	Ser	Glu	Asp	Phe	Asp	Ala	Ile	Val	Gly	
		130					135					140					
	His	Gly	Met	Lys	Leu	Gly	Asp	Lys	Val	Leu	Glu	Thr	Asp	Ile	Ser	Ser	
40		145				150					155				160		
	Phe	Asp	Lys	Ser	Gln	Asp	Gln	Ala	Met	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Met	Leu	
					165					170					175		
45	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	Val	Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Thr	Leu	Ile	Glu	Ala	30
				180					185						190		
	Ser	Phe	Gly	Asp	Ile	Thr	Ser	Ala	His	Leu	Pro	Thr	Gly	Thr	Arg	Phe	
			195					200					205				
50	Gln	Phe	Gly	Ser	Met	Met	Lys	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Thr	Leu	Phe	Val	
		210					215						220				
	Asn	Thr	Leu	Leu	Asn	Ile	Thr	Ile	Ala	Ala	Arg	Val	Leu	Arg	Glu	Gln	
55						230					235				240		

Leu Ala Asp Thr Arg Cys Ala Ala Phe Ile Gly Asp Asp Asn Val Ile
245 250 255

5 Thr Gly Val Val Ser Asp Asp Met Met Val Ala Arg Cys Ala Ser Trp
260 265 270

Leu Asn Met Glu Val Lys Ile Met Asp Met Glu Ile Gly Asn Met Ser
275 280 285

10 Pro Tyr Phe Cys Gly Gly Phe Leu Leu Leu Asp Thr Val Thr Gly Thr
290 295 300

Val Ser Arg Val Ser Asp Pro Val Lys Arg Leu Met Lys Met Gly Lys
305 310 315 320

15 Pro Ala Leu Asn Asp Pro Glu Thr Asp Val Asp Arg Cys Arg Ala Leu
325 330 335

20 Arg Glu Glu Val Glu Ser Trp Tyr Arg Val Gly Ile Gln Trp Pro Leu
340 345 350

Gln Val Ala Ala Ala Thr Arg Tyr Gly Val Asn His Leu Pro Leu Ala
355 360 365

25 Thr Met Ala Met Ala Thr Leu Ala Gln Asp Leu Arg Ser Tyr Leu Gly
370 375 380

Ala Arg Gly Glu Tyr Val Ser Leu Tyr Val
385 390

30

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

- 35 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 1359 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- 40 (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (ix) FEATURE:
 - (D) OTHER INFORMATION: / label= "p130"
- 45 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

30

Met Pro Arg Thr Ala Arg Arg Ser Gly Lys Leu Val Gln Ser Gly Asp
1 5 10 15

50 Ser Val Ala Thr Ala Gly Gly Cys Arg His Thr Leu Trp Arg Glu Pro
20 25 30

Pro Ala Ala Gly His Asn Gly Asp Gly His Ala Arg Pro Gly Leu Glu
55 35 40 45

	Ile Val Pro Gly Arg Ala Arg Gly Val Arg Ile Pro Leu Arg Leu Thr	
	50 55 60	
5	Leu Ile Phe Ser Ala Ser Tyr Phe Gln Thr Ile Met Phe Pro Met Gln	
	65 70 75 80	
	Phe Thr Asn Ser Ala Tyr Arg Gln Met Glu Pro Met Phe Ala Pro Gly	
10	85 90 95	
	Ser Arg Gly Gln Val Gln Pro Tyr Arg Pro Arg Thr Lys Arg Arg Gln	
	100 105 110	
15	Glu Pro Gln Val Gly Asn Ala Ala Ile Thr Ala Leu Ala Asn Gln Met	
	115 120 125	10
	Ser Ala Leu Gln Leu Gln Val Ala Gly Leu Ala Gly Gln Ala Arg Val	
	130 135 140	
20	Asp Arg Arg Gly Pro Arg Arg Val Gln Lys Asn Lys Gln Lys Lys Lys	
	145 150 155 160	
	Asn Ser Ser Asn Gly Glu Lys Pro Lys Glu Lys Lys Lys Lys Gln Lys	
25	165 170 175	
	Gln Gln Glu Lys Lys Gly Ser Gly Gly Glu Lys Val Lys Lys Thr Arg	
	180 185 190	
30	Asn Arg Pro Gly Lys Glu Val Arg Ile Ser Val Lys Cys Ala Arg Gln	
	195 200 205	20
	Ser Thr Phe Pro Val Tyr His Glu Gly Ala Ile Ser Gly Tyr Ala Val	
	210 215 220	
35	Leu Ile Gly Ser Arg Val Phe Lys Pro Ala His Val Lys Gly Lys Ile	
	225 230 235 240	
	Asp His Pro Glu Leu Ala Asp Ile Lys Phe Gln Val Ala Glu Asp Met	
40	245 250 255	
	Asp Leu Glu Ala Ala Ala Tyr Pro Lys Ser Met Arg Asp Gln Ala Ala	
	260 265 270	
45	Glu Pro Ala Thr Met Met Asp Arg Val Tyr Asn Trp Glu Tyr Gly Thr	
	275 280 285	30
	Ile Arg Val Glu Asp Asn Val Ile Ile Asp Ala Ser Gly Arg Gly Lys	
	290 295 300	
50	Pro Gly Asp Ser Gly Arg Ala Ile Thr Asp Asn Ser Gly Lys Val Val	
	305 310 315 320	
	Gly Ile Val Leu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Arg Arg Thr Arg Leu Ser	
55	325 330 335	

	Thr	Ile	Ser	Val	Asn	Phe	Thr	Val	Ile	Ser	Pro	Thr	Thr	Ala	Leu	Glu	
	930						935					940					
5	Tyr	Trp	Thr	Cys	Ala	Gly	Val	Pro	Ile	Val	Glu	Pro	Pro	His	Val	Gly	
	945					950					955					960	
	Cys	Cys	Thr	Ser	Val	Ser	Cys	Pro	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Leu	His	Ala	
10					965					970					975		
	Phe	Thr	Gly	Lys	Ala	Val	Ser	Asp	Val	His	Cys	Asp	Val	His	Thr	Asn	
				980					985					990			
	Val	Tyr	Pro	Leu	Leu	Trp	Gly	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Cys	Ser	Thr	Glu	
15			995					1000					1005				
	Asn	Thr	Gln	Val	Ser	Ala	Val	Ala	Ala	Thr	Val	Ser	Glu	Phe	Cys	Ala	
	1010						1015					1020					
20	Gln	Asp	Ser	Glu	Arg	Ala	Glu	Ala	Phe	Ser	Val	His	Ser	Ser	Ser	Val	
	1025					1030					1035					1040	
	Thr	Ala	Glu	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Gly	Glu	Val	Val	Thr	Ala	Val	His	
25					1045					1050					1055		
	Val	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Arg	Gly	Thr	Asp	Leu	Lys	Ile	
				1060					1065					1070			
	Val	Ala	Gly	Pro	Ile	Thr	Thr	Asp	Tyr	Ser	Pro	Phe	Asp	Arg	Lys	Val	
30			1075					1080					1085				
	Val	Arg	Ile	Gly	Glu	Glu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Trp	Pro	Pro	Tyr	Gly	
	1090					1095						1100					
35	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Arg	Ser	Thr	Asn	
	1105					1110					1115					1120	
	Tyr	Val	Lys	Pro	Asn	Asp	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ile	Gly	Ile	Glu	Val	Leu	
40					1125					1130					1135		
	Gln	Pro	Thr	Asn	Asp	His	Val	His	Val	Ala	Tyr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Ser	
					1140					1145					1150		
	Gly	Leu	Leu	Arg	Trp	Leu	Gln	Asp	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ser	Val	Thr	
45					1155				1160				1165				
	Ala	Pro	His	Gly	Cys	Lys	Ile	Ser	Ala	Asn	Pro	Leu	Leu	Ala	Leu	Asp	
	1170						1175					1180					
50	Cys	Gly	Val	Gly	Ala	Val	Pro	Met	Ser	Ile	Asn	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	
	1185					1190					1195					1200	
	Phe	Thr	Arg	Lys	Leu	Lys	Asp	Pro	Lys	Pro	Ser	Ala	Leu	Lys	Cys	Val	
55					1205					1210					1215		

Val Asp Ser Cys Glu Tyr Gly Val Asp Tyr Gly Gly Ala Ala Thr Ile
1220 1225 1230

5 Thr Tyr Glu Gly His Glu Ala Gly Lys Cys Gly Ile His Ser Leu Thr
1235 1240 1245

Pro Gly Val Pro Leu Arg Thr Ser Val Val Glu Val Val Ala Gly Ala
1250 1255 1260

10 Asn Thr Val Lys Thr Thr Phe Ser Ser Pro Thr Pro Glu Val Ala Leu
1265 1270 1275 1280

Glu Val Glu Ile Cys Ser Ala Ile Val Lys Cys Ala Gly Glu Cys Thr
1285 1290 1295

15 Pro Pro Lys Glu His Val Val Ala Thr Arg Pro Arg His Gly Ser Asp
1300 1305 1310

20 Pro Gly Gly Tyr Ile Ser Gly Pro Ala Met Arg Trp Ala Gly Gly Ile
1315 1320 1325

Val Gly Thr Leu Val Val Leu Phe Leu Ile Leu Ala Val Ile Tyr Cys
1330 1335 1340

25 Val Val Lys Lys Cys Arg Ser Lys Arg Ile Arg Ile Val Lys Ser
1345 1350 1355

10

30 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 282 amino acids
35 (B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

40 (ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: / label= "Capsid"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

45 Met Phe Pro Met Gln Phe Thr Asn Ser Ala Tyr Arg Gln Met Glu Pro
1 5 10 15

Met Phe Ala Pro Gly Ser Arg Gly Gln Val Gln Pro Tyr Arg Pro Arg
20 25 30

50 Thr Lys Arg Arg Gln Glu Pro Gln Val Gly Asn Ala Ala Ile Thr Ala
35 40 45

Leu Ala Asn Gln Met Ser Ala Leu Gln Leu Gln Val Ala Gly Leu Ala
55 50 55 60

20

30

Gly Gln Ala Arg Val Asp Arg Arg Gly Pro Arg Arg Val Gln Lys Asn
 65 70 75 80
 5 Lys Gln Lys Lys Lys Asn Ser Ser Asn Gly Glu Lys Pro Lys Glu Lys
 85 90 95
 Lys Lys Lys Gln Lys Gln Gln Glu Lys Lys Gly Ser Gly Gly Glu Lys
 100 105 110
 10 Val Lys Lys Thr Arg Asn Arg Pro Gly Lys Glu Val Arg Ile Ser Val
 115 120 125
 Lys Cys Ala Arg Gln Ser Thr Phe Pro Val Tyr His Glu Gly Ala Ile
 130 135 140
 15 Ser Gly Tyr Ala Val Leu Ile Gly Ser Arg Val Phe Lys Pro Ala His
 145 150 155 160
 20 Val Lys Gly Lys Ile Asp His Pro Glu Leu Ala Asp Ile Lys Phe Gln
 165 170 175
 Val Ala Glu Asp Met Asp Leu Glu Ala Ala Ala Tyr Pro Lys Ser Met
 180 185 190
 25 Arg Asp Gln Ala Ala Glu Pro Ala Thr Met Met Asp Arg Val Tyr Asn
 195 200 205
 Trp Glu Tyr Gly Thr Ile Arg Val Glu Asp Asn Val Ile Ile Asp Ala
 210 215 220
 30 Ser Gly Arg Gly Lys Pro Gly Asp Ser Gly Arg Ala Ile Thr Asp Asn
 225 230 235 240
 35 Ser Gly Lys Val Val Gly Ile Val Leu Gly Gly Gly Pro Asp Gly Arg
 245 250 255
 Arg Thr Arg Leu Ser Val Ile Gly Phe Asp Lys Lys Met Lys Ala Arg
 260 265 270
 40 Glu Ile Ala Tyr Ser Asp Ala Ile Pro Trp
 275 280

10

20

45 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 71 amino acids
 50 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

55 (ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: / label= "E3"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

5 Thr Arg Ala Pro Ala Leu Leu Leu Leu Pro Met Val Ile Val Cys Thr
 1 5 10 15
 Tyr Asn Ser Asn Thr Phe Asp Cys Ser Lys Pro Ser Cys Gln Asp Cys
 20 25 30
 10 Cys Ile Thr Ala Glu Pro Glu Lys Ala Met Thr Met Leu Lys Asp Asn
 35 40 45
 Leu Asn Asp Pro Asn Tyr Trp Asp Leu Leu Ile Ala Val Thr Thr Cys
 15 50 55 60
 Gly Ser Ala Arg Arg Lys Arg
 65 70

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25 (A) LENGTH: 438 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

20

30

(ix) FEATURE:

(D) OTHER INFORMATION: / label= "E2"

35 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

Ala Val Ser Thr Ser Pro Ala Ala Phe Tyr Asp Thr Gln Ile Leu Ala
 1 5 10 15
 40 Ala His Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Arg Ala Tyr Cys Pro Asp Cys Asp
 20 25 30
 Gly Thr Ala Cys Ile Ser Pro Ile Ala Ile Asp Glu Val Val Ser Ser
 35 40 45
 45 Gly Ser Asp His Val Leu Arg Met Arg Val Gly Ser Gln Ser Gly Val
 50 55 60
 Thr Ala Lys Gly Gly Ala Ala Gly Glu Thr Ser Leu Arg Tyr Leu Gly
 50 65 70 75 80
 Arg Asp Gly Lys Val His Ala Ala Asp Asn Thr Arg Leu Val Val Arg
 85 90 95
 55 Thr Thr Ala Lys Cys Asp Val Leu Gln Ala Thr Gly His Tyr Ile Leu

30

		100						105							110					
		Ala	Asn	Cys	Pro	Val	Gly	Gln	Ser	Leu	Thr	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Asp			
				115					120					125						
5		Gly	Thr	Arg	His	Gln	Cys	Thr	Thr	Val	Phe	Glu	His	Gln	Val	Thr	Glu			
		130					135					140								
10		Lys	Phe	Thr	Arg	Glu	Arg	Ser	Lys	Gly	His	His	Leu	Ser	Asp	Met	Thr			
		145					150					155					160			
		Lys	Lys	Cys	Thr	Arg	Phe	Ser	Thr	Thr	Pro	Lys	Lys	Ser	Ala	Leu	Tyr			
					165						170					175				
15		Leu	Val	Asp	Val	Tyr	Asp	Ala	Leu	Pro	Ile	Ser	Val	Glu	Ile	Ser	Thr			10
					180					185					190					
		Val	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	Ser	Gln	Cys	Thr	Val	Arg	Val	Pro	Pro	Gly			
				195					200					205						
20		Thr	Thr	Val	Lys	Phe	Asp	Lys	Lys	Cys	Lys	Ser	Ala	Asp	Ser	Ala	Thr			
		210						215					220							
25		Val	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Ser	Gln	Thr	Phe	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Val			
		225					230					235					240			
		Leu	Thr	Ala	Ala	Ser	Ile	Thr	Gln	Gly	Lys	Pro	His	Leu	Arg	Ser	Ala			
					245						250					255				
30		Met	Leu	Pro	Ser	Gly	Gly	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Arg	Ile	Pro	Phe	Pro			20
					260					265					270					
		Phe	Pro	Pro	Glu	Thr	Ala	Thr	Cys	Arg	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Leu	Pro			
				275					280					285						
35		Ser	Ile	Thr	Tyr	Glu	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	Leu	Ala	Gly	Thr	Ala	Lys			
		290						295					300							
40		Tyr	Pro	Val	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Asn	Leu	Gly	Phe	His	Ser	Asn	Ala			
		305					310					315					320			
		Thr	Ser	Glu	Trp	Ile	Gln	Gly	Lys	Tyr	Leu	Arg	Arg	Ile	Pro	Val	Thr			
					325						330					335				
45		Pro	Gln	Gly	Ile	Glu	Leu	Thr	Trp	Gly	Asn	Asn	Ala	Pro	Met	His	Phe			
					340					345					350					
		Trp	Ser	Ser	Val	Arg	Tyr	Ala	Ser	Gly	Asp	Ala	Asp	Ala	Tyr	Pro	Trp			
				355					360					365						
50		Glu	Leu	Leu	Val	Tyr	His	Thr	Lys	His	His	Pro	Glu	Tyr	Ala	Trp	Ala			
		370						375					380							
55		Phe	Val	Gly	Val	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Ala	Ile	Ala	Ala	Cys	Met	Phe			
		385					390					395				400				

Ala Cys Ala Cys Ser Arg Val Arg Tyr Ser Leu Val Ala Asn Thr Phe
405 410 415

5 Asn Ser Asn Pro Pro Pro Leu Thr Ala Leu Thr Ala Ala Leu Cys Cys
420 425 430

Ile Pro Gly Ala Arg Ala
435

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
15 (A) LENGTH: 32 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: protein

20

(ix) FEATURE:
(D) OTHER INFORMATION: / label= "6K"

25 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

Asp Gln Pro Tyr Leu Asp Ile Ile Ala Tyr Phe Leu Gly Val Arg Gly
1 5 10 15

30 Trp Ser Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Tyr Val Gln Ser Cys Lys Ser
20 25 30

20

35 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 461 amino acids
40 (B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(ix) FEATURE:
45 (D) OTHER INFORMATION: / label= "E1"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

50 Tyr Glu His Thr Val Val Val Pro Met Asp Pro Arg Ala Pro Ser Tyr
1 5 10 15

Glu Ala Val Ile Asn Arg Asn Gly Tyr Asp Pro Leu Lys Leu Thr Ile
20 25 30

55

	Ser	Val	Asn	Phe	Thr	Val	Ile	Ser	Pro	Thr	Thr	Ala	Leu	Glu	Tyr	Trp	
			35					40					45				
5	Thr	Cys	Ala	Gly	Val	Pro	Ile	Val	Glu	Pro	Pro	His	Val	Gly	Cys	Cys	
		50					55					60					
	Thr	Ser	Val	Ser	Cys	Pro	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Leu	His	Ala	Phe	Thr	
	65					70					75					80	
10	Gly	Lys	Ala	Val	Ser	Asp	Val	His	Cys	Asp	Val	His	Thr	Asn	Val	Tyr	
					85					90					95		
	Pro	Leu	Leu	Trp	Gly	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Cys	Ser	Thr	Glu	Asn	Thr	
15				100					105					110			10
	Gln	Val	Ser	Ala	Val	Ala	Ala	Thr	Val	Ser	Glu	Phe	Cys	Ala	Gln	Asp	
			115					120					125				
	Ser	Glu	Arg	Ala	Glu	Ala	Phe	Ser	Val	His	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	
20		130					135					140					
	Glu	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Gly	Glu	Val	Val	Thr	Ala	Val	His	Val	Tyr	
	145					150					155					160	
25	Val	Asp	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Arg	Gly	Thr	Asp	Leu	Lys	Ile	Val	Ala	
					165					170					175		
	Gly	Pro	Ile	Thr	Thr	Asp	Tyr	Ser	Pro	Phe	Asp	Arg	Lys	Val	Val	Arg	
30				180					185					190			20
	Ile	Gly	Glu	Glu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Trp	Pro	Pro	Tyr	Gly	Ala	Gly	
			195				200						205				
	Arg	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Arg	Ser	Thr	Asn	Tyr	Val	
35		210					215					220					
	Lys	Pro	Asn	Asp	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ile	Gly	Ile	Glu	Val	Leu	Gln	Pro	
						230					235				240		
40	Thr	Asn	Asp	His	Val	His	Val	Ala	Tyr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Ser	Gly	Leu	
					245					250					255		
	Leu	Arg	Trp	Leu	Gln	Asp	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Pro	
45				260					265					270			30
	His	Gly	Cys	Lys	Ile	Ser	Ala	Asn	Pro	Leu	Leu	Ala	Leu	Asp	Cys	Gly	
			275					280					285				
	Val	Gly	Ala	Val	Pro	Met	Ser	Ile	Asn	Ile	Pro	Asp	Ala	Lys	Phe	Thr	
50							295					300					
	Arg	Lys	Leu	Lys	Asp	Pro	Lys	Pro	Ser	Ala	Leu	Lys	Cys	Val	Val	Asp	
	305					310					315					320	
55	Ser	Cys	Glu	Tyr	Gly	Val	Asp	Tyr	Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Ile	Thr	Tyr	

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

5 TGCATGCGGC CGCTTGTTATT GAAAATTTTA AAACCAA 37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10 (A) LENGTH: 37 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: unknown
 (D) TOPOLOGY: unknown

15 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA 10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11

TGCATGCGGC CGCATGACAC GCGCTCCGGC CCTCCTG 37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 40 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: unknown
 (D) TOPOLOGY: unknown 20

30 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

35

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

TGCATGCGGC CGCTCACGCG CGAGCCCCTG GTATGCAACA 40

40 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

45 (A) LENGTH: 37 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: unknown
 (D) TOPOLOGY: unknown 30

50 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

55 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

TGCATGCGGC CGCATGGCTG TGTCTACGTC GCCTGCC

37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 204 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: unknown
 - (D) TOPOLOGY: unknown

10

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

15

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

GACCAACCCCT ACTTGGACAT CATTGCCTAC TTGTGGACCA ACAGCAAAGT GGCCTTCGGG 60
 20 CTACAATTTG CGCGCCCCGT GGCCTGTGTG CTCATCATTG CATAACGCCCT TAGGCACTGC 120
 AGATTGTGCT GCAAGTCTTT TTTAGGGGTA AGAGGGTGGT CAGCCCTGCT GGTCATCCTT 180
 GCGTATGTAC AGAGCTGCAA GAGC 204

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 68 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

30

- (ii) MOLECULE TYPE: protein

35

- (ix) FEATURE:
 - (D) OTHER INFORMATION: / label= "6K"

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

40 Asp Gln Pro Tyr Leu Asp Ile Ile Ala Tyr Leu Trp Thr Asn Ser Lys
 1 5 10 15
 Val Ala Phe Gly Leu Gln Phe Ala Ala Pro Val Ala Cys Val Leu Ile
 20 25 30
 45 Ile Thr Tyr Ala Leu Arg His Cys Arg Leu Cys Cys Lys Ser Phe Leu
 35 40 45
 Gly Val Arg Gly Trp Ser Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Tyr Val Gln
 50 55 60
 Ser Cys Lys Ser
 65

55

10

20

30

【 図 1 】

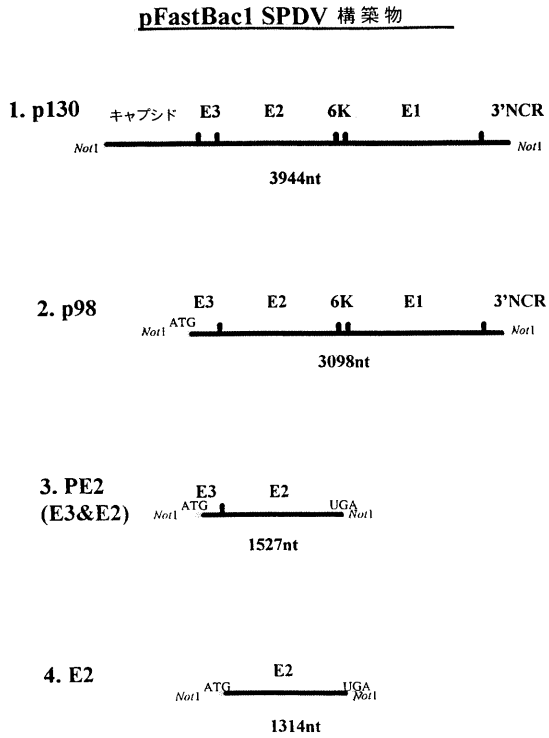


FIGURE 1

【 図 2 】

TGC AGC AGG GTG CGG TAC TCT CTG GTC GCC AAC
C S R V R Y S L V A N

ACG TTC AAC CCG AAC CCA CCA CCA TTG ACC GCA
T F N P N P P P L T A
E2 C末端

CTG ACT GCA GCA CTG TGT TGC ATA CCA GGG GCT
L T A A L C C I P G A

CGC GCG GAC CAA CCC TAC TTG GAC ATC ATT GCC (27)
R A D Q P Y L D I I A (9)

TAC TTG TGG ACC AAC AGC AAA GTG GCC TTC GGG (60)
Y L W T N S K V A F G (20)

CTA CAA TTT GCG GCG CCC GTG GCC TGT GTG CTC (93)
L Q F A A P V A C V L (31)

ATC ATT ACA TAC GCC CTT AGG CAC TGC AGA TTG (126)
I I T Y A L R H C R L (42)

TGC TGC AAG TCT TTT TTA GGG GTA AGA GGG TGG (159)
C C K S F L G V R G W (53)

TCA GCC CTG CTG GTC ATC CTT GCG TAT GTA CAG (192)
S A L L V I L A Y V Q (64)

AGC TGC AAG AGC TAC GAA CAC ACC GTG GTG GTC (204)
S C K S Y E H T V V V (68)

E1 N末端

CCA ATG GAT CCA AGA GCC CCG TCG TAC GAA GCA
P M D P R A P S Y E A

GTG ATA AAC CCG AAT GGG TAT GAT CCA TTG AAG
V I N R N G Y D P L K

CTG ACC ATC TCA GTG AAT TTC ACC GTC ATC TCA
L T I S V N F T V I S

CCA ACT ACG GCT CTG GAA T 3'
P T T A L E

FIGURE 2

フロントページの続き

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ウェストン, ジョナサン

イギリス国、ベルファースト・ピー・ティー・５・６・ピー・エス、キングズ・ドライブ・２５

(72)発明者 トツド, ダニエル

イギリス国、ベルファースト・ピー・ティー・８・８・エヌ・エヌ、プレニム・パーク・１０

審査官 山中 隆幸

(56)参考文献 特開平０８ - ２２８７７０ (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

BIOSIS/WPI(DIALOG)