

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3878132号

(P3878132)

(45) 発行日 平成19年2月7日(2007.2.7)

(24) 登録日 平成18年11月10日(2006.11.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 9/50 (2006.01)	C 1 2 N 9/50 Z N A
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z

請求項の数 7 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2002-550090 (P2002-550090)	(73) 特許権者	501263533
(86) (22) 出願日	平成13年12月13日 (2001.12.13)		ベーリンガー インゲルハイム (カナダ)
(65) 公表番号	特表2004-514459 (P2004-514459A)		リミテッド
(43) 公表日	平成16年5月20日 (2004.5.20)		カナダ ケベック エイチ7エス 2ジ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2001/001796		ー5 ラヴァル キュナール ストリート
(87) 国際公開番号	W02002/048375		2100
(87) 国際公開日	平成14年6月20日 (2002.6.20)	(74) 代理人	100059959
審査請求日	平成15年9月4日 (2003.9.4)		弁理士 中村 稔
(31) 優先権主張番号	60/256,031	(74) 代理人	100067013
(32) 優先日	平成12年12月15日 (2000.12.15)		弁理士 大塚 文昭
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精製活性型HCV NS2/3プロテアーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リフォールディングされた不活性型HCV NS2/3プロテアーゼを作製する方法であって、
a) グアニジン-HCl、グアニジン及び尿素からなる群より選択されるカオトロピック試薬の存在下で前記プロテアーゼを単離する工程；
b) 濃度を低下させた前記カオトロピック試薬又は極性添加物の存在下で還元試薬及びラウリルジエチルアミノオキシド(LDAO)と接触させることによって前記単離プロテアーゼをリフォールディングさせる工程であって、前記LDAOの最終濃度が臨界ミセル濃度以上であり、前記カオトロピック試薬又は前記極性添加物がグアニジン、グアニジン-HCl、尿素及びアルギニン-HClからなる群より選択され、前記還元試薬がTCEP及びDTTからなる群より選択され、前記NS2/3プロテアーゼが完全長NS2/3プロテアーゼ又はNS2/3プロテアーゼのアミノ酸配列において残基番号810～906のいずれかのアミノ酸残基から始まり残基番号1206のアミノ酸残基で終わるNS2/3プロテアーゼ短縮片である前記工程：を含む前記方法。

【請求項2】

NS2/3プロテアーゼが、HCV 1b-40完全長NS2/3プロテアーゼの残基番号904～1206のアミノ酸残基を少なくとも含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

NS2/3プロテアーゼが、配列番号4、10、11、12、13及び14のいずれかによって規定するアミノ酸配列からなる短縮NS2/3プロテアーゼである、請求項2記載の方法。

【請求項4】

NS2/3プロテアーゼが、配列番号10によって規定するアミノ酸配列からなる短縮NS2/3プロテアーゼである、請求項2記載の方法。

【請求項5】

c) 請求項1記載の方法によって作製したリフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼを、活性化界面活性剤を含む媒体中に希釈し、前記NS2/3プロテアーゼの自己切断を誘導する工程であって、LDA0の最終濃度が0.1%以下に希釈され、前記活性化界面活性剤がCHAPS、トライトンX-100、NP-40及びn-ドデシル-β-D-マルトシドからなる群より選択されて最終濃度0.1%~1%である前記工程：を含む活性型NS2/3プロテアーゼを作製する方法。

【請求項6】

NS2/3プロテアーゼの自己切断活性を測定する方法であって、

d) 請求項5の方法によって作製した活性型NS2/3プロテアーゼを、NS2/3プロテアーゼの自己切断を誘導して切断生成物又はそのフラグメントを作製するのに十分な時間インキュベートすること；及び

e) 未切断NS2/3プロテアーゼ、切断生成物又はそのフラグメントの有無を測定すること：を含む前記方法。

【請求項7】

活性型NS2/3プロテアーゼの自己切断活性の潜在的阻害剤をスクリーニングするアッセイであって、

a) 潜在的阻害剤の存在下又は非存在下で、請求項6記載の方法を行うこと；

b) 潜在的阻害剤の存在下又は非存在下で、未切断NS2/3プロテアーゼ、切断生成物又はそのフラグメントの量を比較すること：を含む前記アッセイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は概して、C型肝炎ウイルス(HCV)NS2/3プロテアーゼの精製方法及び活性化方法に関し、特に、自己切断のために後に活性化することが可能であるリフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼ又はその短縮片を作製する方法に関する。加えて特に本方法は、短縮及び精製された活性型HCV NS2/3プロテアーゼ、及び、その阻害剤を同定するためのアッセイを提供する。

(背景技術)

C型肝炎ウイルス(HCV)は、人間に肝硬変及び末期の肝臓疾患をもたらす慢性肝臓疾患の有力な原因である。世界中で一億五千万人以上の人々が持続的にHCVに感染し、慢性感染症に起因し得る死亡者数は今後10~20年の間に劇的に増加するだろう。現在有用な治療法は効果が限定されており、十分でない。これらの治療法は、単独又はリバビリンのような他の抗ウイルス薬と併せて、インターフェロンαの使用を必要としている。患者の再発率の高さ及び副作用に加えて、その低い反応速度が観察されることを考慮すると、長期的な治療上の利益を与え得る新しい治療法が必要とされている。

【0002】

クローン化され特徴付けられたHCVゲノムの部分的及び全体配列は、将来的な抗ウイルス治療を目的として適切な標的を提供するために解析されている。HCVはフラビ・ウイルス科系統群に属する、外被膜で覆われたプラス鎖RNAウイルスである。一重鎖のHCV RNAゲノムは長さおよそ9600のヌクレオチドであり、約3010アミノ酸の単一の大きなポリタンパク質をコードする、単一のオープンリーディングフレーム(ORF)を有する。感染した細胞内で、このポリタンパク質は細胞及びウイルスのプロテアーゼによって複数の部位で切断され、構造タンパク質及び非構造(NS)タンパク質が産生される。HCVの場合には、成熟非構造タンパク質(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A及びNS5B)の生成が、2つのウイルスプロテアーゼによって行われている。第一のウイルスプロテアーゼは未だ特徴付けが不十分であるが、NS2/3接合部を切断し、これ以降はNS2/3プロテアーゼと呼ばれる。第二のウイルスプロテアーゼはNS3のN末端領域内に含まれるセリンプロテアーゼであり、これ以降はNS3プ

10

20

30

40

50

ロテアーゼと呼ばれ、NS3/4A切断部位に対してはシス、残りのNS4A/4B、NS4B/5A、NS5A/5B部位に対してはトランスに、NS3の下流に続く全ての切断を媒介する。NS4Aタンパク質は、NS3プロテアーゼに対する補助因子としての作用、及びおそらくは、NS3及び他のウイルスレプリカーゼ構成成分の膜局在性を補助することなど、複数の機能に貢献するようである。NS3タンパク質のNS4Aとの複合体形成は、前記部位の全てにおいてタンパク質分解効率を増強し、プロセシング現象に必要であると考えられる。NS3タンパク質は、ヌクレオシドトリフォスファターゼ活性及びRNAヘリカーゼ活性も示す。NS5BはRNA依存性のRNAポリメラーゼであって、HCVの複製に必要とされる。

HCVがコードする酵素の大部分、すなわち、NS3のプロテアーゼ、ヘリカーゼ及びATPアーゼ活性、及び、NS5BのRNA依存性RNAポリメラーゼ活性は、新しい抗ウイルス治療開発の標的として評価されている (Dymock, B.W. et al. (2000) *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 11(2):79-96及びWalker, M.A. (1999) *Drug Discovery Today* 4(11):518-529)。今のところ詳細に特徴付けられていないウイルス酵素はNS2/3プロテアーゼだけであり、おそらく、これが同時翻訳的に働くからである。

【0003】

NS2/3プロテアーゼはNS2とNS3接合部のアミノ酸Leu1026とAla1027間の自己切断に関係している (Hirowatari, Y., et al (1993) *Arch. Virol.* 133:349-356及びReed, K.E., et al (1995) *J. Virol.* 69(7)4127-4136)。この切断は、NS2/3プロテアーゼ活性を欠損するクローンを接種してもチンパンジーにHCV感染症が起らないことに示されるように、*in vivo*の増殖性複製に必要不可欠であるらしい (Kolykhalov, A.A., et al (2000) *J. Virol.* 74(4)2046-2051)。機能的NS2及び真正NS3プロテアーゼN末端配列の生成が、ある程度NS5Aリン酸化に関連しているらしい (Liu, Q., et al. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 572-577及びNeddermann P., et al (1999) *J. Virol.* 73(12):9984-9991)。

自己切断活性のために必要とされるHCVオープンリーディングフレームの最小領域は、N末端境界側アミノ酸898及び907とC末端境界側アミノ酸1206の間のどこかに位置することが報告されている (Hijikata, M. et al (1993) *J. Virol.* 67(8):4665-4675、Grakoui, A., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10583-10587、Santolini, E., et al (1995) *J. Virol.* 69(12):7461-7471、Liu, Q., et al (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 572-577、Pallaoro et al., (2001) *J. Virol.* 75(20):9939-46)。興味深いことに、NS2/3プロテアーゼ活性はNS3プロテアーゼ活性と無関係であるが (Grakoui, A., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10583-10587、Hijikata, M. et al (1993) *J. Virol.* 67(8):4665-4675)、NS3プロテアーゼドメインを別の非構造タンパク質によって置換することはできない (Santolini, E., et al (1995) *J. Virol.* 69(12):7461-7471)。変異誘発研究は、His952及びCys993残基がシス-切断活性に必要不可欠であることを示している (Grakoui, A., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10583-10587、Hijikata, M. et al (1993) *J. Virol.* 67(8):4665-4675)。Gorbalenya, A.E 等 ((1996) *Perspect. Drug Discovery Design*. 6:64-86)は、NS2/3プロテアーゼがシステインプロテアーゼになり得ることを示唆している。しかしながら、その活性が金属イオンによって刺激されEDTAによって阻害されるという知見は、NS2/3プロテアーゼがメタロプロテアーゼであるという示唆を導く (Grakoui, A., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10583-10587、Hijikata, M., et al. (1993) *J. Virol.* 67(8):4665-4675)。*In vitro*の転写及び翻訳アッセイにおける古典的プロテアーゼインヒビターの研究 (Pieroni, L., et al. (1997) *J. Virol.* 71(9):6373-6380)では、未だ明確な分類ができていない。

【0004】

NS2/3領域の発現に続くNS2/3接合部におけるプロセシングが、無細胞翻訳系、*E. coli*、バキュロウイルス組換え体を感染させた昆虫細胞及び/又は哺乳動物細胞（一過性トランスフェクション又はワクシニア・ウイルスT7融合系）において報告されている (Darke, P.L., et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(49)34511-34514及びW0 01/16379、Grakoui, A., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10583-10587、Hijikata, M., et al. (1993) *J. Virol.* 67(8):4665-4675、Pieroni, L., et al. (1997) *J. Virol.* 71(9):6373-6380、Santolini, E., et al. (1995) *J. Virol.* 69(12):7461-7471)。しかしながら、単離組換え酵素におけるプロセシ

10

20

30

40

50

グは、ごく最近まで報告されていなかった(Pallaoro et al., (2001)J.Virol.75(20):9939-46、Thibeault et al., J.Biol.Chem.276(49):46678-46684)。

Grakoui等((1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:10583-10587)及びKomoda等((1994)Gene, 145:221-226)は両方とも、E.coliにおいて、NS2/3プロテアーゼを含むHCVポリペプチドの発現を開示している。発現に続くプロセッシングは、細胞可溶化液のSDS-PAGE及び免疫ブロット分析から評価された。Komodaも、N末端にマルトース結合タンパク質(MBP)、C末端にジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHER)を融合させたHCVポリタンパク質を用いて、N末端シークエンシングのみを目的として、アフィニティークロマトグラフィーによる細胞可溶化液からのDHFR融合生成物の部分精製を報告している。

【0005】

このようにして、NS2/3プロテアーゼのメカニズム研究及び構造研究だけでなく生化学的特性の研究も、この酵素の純粋な組換え体が入手困難であるために、妨げられている。NS2/3プロテアーゼの潜在的阻害剤が高速大量処理スクリーニング形式により同定可能になる以前に、精製活性型NS2/3プロテアーゼの信頼性のある供給源が存在しなければならない。

2001年9月20日に公開されたW0 01/68818 {及びPallaoro et al., (2001)J.Virol.75(20);9939-46} は、活性型NS2/3プロテアーゼ組換え体を精製する方法を記述している。しかしながら、そのリフォールディング方法は自己触媒作用を避けるために4°Cで行われる必要がある。

本発明の方法は、Thibeault等のJ.Biol.Chem.276(49):46678-46684においても開示されるが、2段階で進行する精製方法を開示する。この方法は室温で行うことができ、スケールアップすることが可能で自己切断なしに安定に保存できる可溶性の不活性型NS2/3プロテアーゼ(室温で安定)の最初の例である。

従って、本発明の優れている点は、リフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼを精製する方法を提供することである。

本発明のさらに優れている点は、大規模スクリーニング試験のために、可溶性の不活性型プロテアーゼをさらに活性化させて可溶性の活性型NS2/3プロテアーゼを作製することができる点である。

また、本発明のさらに優れている点は、精製活性型NS2/3プロテアーゼ組換え体、及び、小型分子及びリガンドを潜在的阻害剤としてスクリーニングすることが可能な規模の前記プロテアーゼ短縮型を提供することである。

本明細書の記述で言及する多数の文献及びその内容は、参照により、本明細書に含まれるものとする。

【0006】

(発明の要約)

本発明は、HCV NS2/3プロテアーゼの精製及び活性化の新規方法を提供することにより、先行技術の難点及び不利益を減少させる。この方法は、プロテアーゼの自己切断を促進させない状態で、前記プロテアーゼを可溶化及びリフォールディングする点で優れている。加えて本方法は、E.coliでの発現へ続く組換え方法を用いて、NS2/3プロテアーゼのN末端短縮型を封入体中に高レベルで産生する点でさらに優れている。この高レベル産生は、多量のプロテアーゼを単離して精製することを可能とする。

これは、自己触媒作用を進行させることなく室温で安定な、単離不活性型NS2/3プロテアーゼの最初の報告である。これはまた、本発明の方法から得られる精製活性型NS2/3プロテアーゼ組換え体の最初の報告である。精製NS2/3プロテアーゼ組換え体が入手できることは、この酵素の生化学的特性を詳細にすること及び新規阻害剤をスクリーニングするためのin vitroアッセイの発展を可能にするであろう。

第一態様によれば、本発明は以下の工程を含む、リフォールディングされた不活性型HCV NS2/3プロテアーゼを作製する方法を提供する：

a)カオトロピック試薬の存在下でプロテアーゼを単離する工程；

b)濃度を低下させたカオトロピック試薬又は極性添加物の存在下、還元試薬及びラウリル

10

20

30

40

50

ジエチルアミンオキシド(LDAO)と接触させることにより、単離したプロテアーゼをリフォールディングする工程。

本発明の第二態様によると、以下を含む活性型NS2/3プロテアーゼ作製方法が提供される：

c)工程b)で得られた可溶性の不活性型NS2/3プロテアーゼを含む媒体に活性化物質を加え、その結果、NS2/3プロテアーゼの自己切断を誘起する切断/活性化緩衝液を形成させること。

【0007】

第三態様では、本発明は、以下を含むNS2/3プロテアーゼの活性を検定する方法を提供する：

d)NS2/3プロテアーゼを工程c)の切断/活性化緩衝液中に、自己切断に十分な時間インキュベートすること；及び

e)自己切断の指標として、切断生成物又はそのフラグメントの有無を測定すること。

本発明の第四態様によれば、以下を含む、NS2/3プロテアーゼのプロテアーゼ活性を阻害する候補薬物又はリガンドをスクリーニングするためのアッセイを提供する：

d)候補薬物又はリガンドの存在下、又は非存在下で、工程c)の切断/活性化緩衝液中にNS2/3プロテアーゼサンプルを十分な時間インキュベートすること；

e)切断生成物又はそのフラグメントの量を測定すること；及び

f)前記候補薬物又はリガンドの存在下、又は非存在下で、切断生成物又はそのフラグメントの量を比較すること。

本発明の第五態様によると、リフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼ、図1Bにおいて用いられる番号に従って番号付けられた完全長NS2/3プロテアーゼの残基906～1206の最小アミノ酸配列を有する前記プロテアーゼ短縮片又はその機能的に等価な変異体を提供する。

本発明の第六態様によると、完全長NS2/3プロテアーゼ、それらの短縮片又は配列番号2、4、10、11、12、13、14及び15によって定義される配列より選択される、単離NS2/3プロテアーゼを含む組成物を提供する（ここで、前記プロテアーゼは、前記プロテアーゼの自己切断を阻害するのに十分な濃度のLDAOを含む溶液中に存在する）。

【0008】

本発明を一般的に説明してきたが、例として好ましい態様を示しつつ添付の図面を参照する。

（好ましい態様の詳細な説明）

定義

特に定義されない限り、本明細書中に用いられる全ての技術的及び科学的用語は、発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。一般に、細胞培養の手順、感染、分子生物学的手法などは、前記技術分野において用いられる通常の方法である。これらの技術は、例えばSambrook等(1989,Molecular Cloning - A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratories)及びAusubel等(1994,Current Protocols in Molecular Biology,Wiley,New York)のようなリファレンス・マニュアルにおいて見出すことができる。

本明細書において、ヌクレオチド配列は一重鎖で5'から3'方向で左から右に、この技術分野においてIUPAC-IUB生化学命名法委員会の勧告(Biochemistry,1972,11:1726-1732)に従って通常用いられる1文字のヌクレオチド記号を用いて表される。

本明細書で用いられる「NS2/3プロテアーゼ」、「プロテアーゼ」及び「酵素」という用語は、本明細書中を通じて互換的に用いられ、HCVがコードするNS2/3プロテアーゼを指す。

本明細書で用いられる「活性型NS2/3プロテアーゼ」という用語は、検出可能なレベルの1026-1027残基間を切断する活性を保持しているNS2/3プロテアーゼを表すことを意図する。前記プロテアーゼ活性は、例えばELISA又はウエスタンブロット分析のような酵素アッセイ法によって、残存する未切断NS2/3プロテアーゼ、NS2タンパク質又はNS3プロテアー

10

20

30

40

50

ゼのような切断生成物、又はそれらのフラグメントをモニターすることによって測定される。

本明細書でNS2/3プロテアーゼに言及する時に用いられる「単離された」という用語は、細胞成分に関してNS2/3プロテアーゼが濃縮されているのを意味することを意図する。特に、この用語は、混入する細胞成分と比較してNS2/3プロテアーゼが50%以上に濃縮されていることを意味する。

【0009】

本明細書でNS2/3プロテアーゼに言及する時に用いられる「精製」又は「精製された」という用語は、混入する細胞成分が実質的に存在しないNS2/3プロテアーゼを意味することを意図する。好ましくは、NS2/3プロテアーゼは約90%の純度に精製される。さらに好ましくは、NS2/3プロテアーゼは約95%に精製される。NS2/3プロテアーゼは約98%の純度に精製されるのが、最も好ましい。

本明細書で用いられる「不活性型NS2/3プロテアーゼ」という用語は、SDS-PAGEによって測定した場合に残基Leu1026-Ala1027間を切断する活性を著しく減少した、又は、本質的に除去されたNS2/3プロテアーゼを表すことを意図している。

本明細書で用いられる「核酸分子」という用語は、DNA分子（例えば、cDNA又はゲノムDNA）及びRNA分子（例えば、mRNA）を含むことを意図する。この核酸分子は一重鎖又は二重鎖であってもよいが、好ましくは二重鎖のDNAである。

本明細書で用いられる「ベクター」という用語は、連結している別の核酸分子を運搬することが可能な核酸分子を指す。ベクターの一つのタイプは「プラスミド」であり、付加的DNA断片をその中に結合することができる環状二重鎖DNAループを指す。ベクターのもう一つのタイプはウイルスベクターであり、付加的DNA断片をウイルスゲノム中に結合することができる。ある種のベクターは、それらが導入されている宿主細胞内において自律増殖する能力がある（例えば、細菌性複製開始点を有する細菌ベクター及びエピソード性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、従って宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある種のベクターは、操作可能なように連結されている遺伝子発現を行わせる能力がある。このようなベクターを本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形をとることが多い。プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用される形であるため、本明細書において「プラスミド」及び「ベクター」は互換的に用いることがある。しかしながら、本発明はウイルスベクターのような、同等な機能を果たす前記以外の形態を含むことを意図する。

【0010】

本明細書で用いられる「宿主細胞」という用語は、本発明の組換え発現ベクターのような、本発明の核酸がその中に導入される細胞を指すことを意図する。「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書中では互換的に用いられる。前記用語は、特定の対象細胞だけでなく、それらの細胞の子孫又は潜在的子孫も指すことが理解されるべきである。突然変異または環境的影響のためにある種の修飾が後継世代に起こり得るため、前記子孫は実際には親細胞と同一でないことがあり得るが、その場合も本明細書で用いられる用語の範囲内には含まれる。

本明細書で用いられる「組換え」又は「組換え的に産生された」という用語は、細胞が、起源が細胞外因性である核酸分子を複製又は発現している、又は前記核酸分子によってコードされるペプチド又はタンパク質を発現しているのを指すことを意図する。特に、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）型においては見出されない遺伝子を発現することができる。

本明細書で用いられる「機能的に等価な変異体」とはNS2/3プロテアーゼを記述する場合に用いられ、一つないしはそれ以上のアミノ酸が他のアミノ酸又は天然でないアミノ酸に置換されたタンパク質配列であって、NS2/3プロテアーゼ活性が実質的に影響されないものを指すことを意図する。前記置換は、保存的なアミノ酸置換又は縮退核酸置換を含む。タンパク質配列に関する場合、必ずしも必要ではないが、置換するアミノ酸は通常、置換

10

20

30

40

50

されるアミノ酸と同様な物理化学的特性を有する。前記同様な物理化学的特性は、電荷、かさ高性、疎水性、親水性などにおける類似性を含む。最も一般的に知られる保存性のアミノ酸置換の一部は以下のものを含むが、これだけに限られない：Leu又はVal又はIle；Gly又はAla；Asp又はGlu；Asp又はAsn又はHis；Glu又はGln；Lys又はArg；Phe又はTrp又はTyr；Val又はAla；Cys又はSer；Thr又はSer；及びMet又はLeu。

本明細書でNS2/3プロテアーゼに言及する際に用いられる「阻害する」という用語は、自己切断のプロテアーゼ活性が減少させられるのを意味することを意図する。NS2/3プロテアーゼを阻害することのできる薬物又はリガンド（以下では「潜在的阻害剤」と呼ばれる）は、細胞集団へのHCV感染を調節するために有用であり、従って、細胞内におけるHCVの存在によって特徴付けられる病症を治療するための薬として有用であろう。

10

【0011】

本明細書でNS2/3プロテアーゼに言及する際に用いられる「リフォールディングされた」という用語は、室温において検出し得る自己切断活性を伴わない可溶性及び安定な高次構造を獲得するために、広げられた、又は不適切に折り畳まれたNS2/3プロテアーゼによって行われる高次構造変化（部分的又は全体）の工程を指すことを意図する。前記リフォールディングされたタンパク質は、活性化されるために、活性化界面活性剤の添加を必要とする。

本明細書でNS2/3プロテアーゼを記述する際に用いられる「自己切断」又は「自己切断された」という用語は、外因性の基質を伴わずにNS2/3接合部(Leu1026-Ala1027)で起こる分子内の切断を意味することを意図する。

20

本明細書で用いられる「アフィニティーラベル」又は「アフィニティータグ」は、相補的リガンドによって特異的に捕捉される標識を指す。アフィニティーマーカ/アフィニティーリガンドの対の例は、以下のものを含むが、これだけに限られない：マルトース結合タンパク質(MBP)/マルトース；グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)/グルタチオン；ヒスチジン(His)/金属；ストレプトアビジン・タグ/ストレプトアビジン又はニュートルアビジン(neutravidin)。アフィニティーリガンドとして用いられる金属は、以下のものからなる群より選択されてもよい：コバルト、亜鉛、銅、鉄及びニッケル(Wong et al.(1991)Separation and Purification Methods,20(1),49-106)。前記アフィニティーラベルはタンパク質のN又はC末端に位置付けることができるが、好ましくはタンパク質のN末端である。前記選択される金属は、ニッケルが好ましい。前記アフィニティーリガンドは、アフィニティークロマトグラフィーによる分離を容易にするために、カラム内に配置されることが可能である。

30

【0012】

(好ましい態様)

I. リフォールディング及び精製の方法

本発明の第一態様の第一側面によれば、以下の工程を含むリフォールディングされた不活性型HCV NS2/3プロテアーゼを作製する方法が提供される：

- a) 高濃度のカオトロピック試薬の存在下で、封入体からプロテアーゼを単離する工程；
- b) 低濃度のカオトロピック試薬又は極性添加物の存在下で還元試薬及びLDA0と接触させることにより、前記単離プロテアーゼをリフォールディングする工程。

40

第一態様の好ましい側面では、組換えDNA技術を用いて活性型NS2/3プロテアーゼが作製される。本発明の発現ベクター（実施例を参照）は、本発明の核酸を宿主細胞内でのタンパク質発現に適した形態で含む。これは、組換え発現ベクターが一つないしはそれ以上の調節配列を含み、その配列は発現に用いられるために宿主細胞に基づいて選択されて、発現されるタンパク質をコードする核酸配列に操作的に連結されることを意味する。組換え発現ベクターにおいて「操作可能なように連結された」とは、対象とするヌクレオチド配列が、対応するアミノ酸配列を発現することを可能にする様式で調節配列に連結される（例えば、in vitroの転写/翻訳系において、又は、ベクターが宿主細胞に導入される場合には宿主細胞内において）ことを意味することを意図する。「調節配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー及び他の発現調節因子（例えば、ポリアデニル化シグナル）を

50

含むことを意図する。これらの調節配列は、例えばGoeddelのGene Expression Thechnology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif.(1990)において、記述されている。調節配列は、多様な宿主細胞において構成的ヌクレオチド配列発現を支配する配列、及び、ある種の宿主細胞内のみにおいてヌクレオチド配列発現を支配する配列（例えば、組織特異的調節配列）を含む。発現ベクターの設計は、トランスフォームする宿主細胞の選択、要求するタンパク質発現のレベル等の要因に依存し得るということは、当業者には理解できるであろう。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入される結果として、本明細書に記述される核酸によってコードされるタンパク質又はペプチド（例えば、NS2/3プロテアーゼ、NS2/3プロテアーゼの短縮型又は変異体）を産生することができる。

【0013】

本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞又は真核細胞内でのNS2/3プロテアーゼ発現のために設計することが可能である。例えば、NS2/3プロテアーゼは、E.coliのような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞又は哺乳動物細胞内において、発現させることが可能である。適切な宿主細胞は、GoeddelのGene Expression Thechnology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif.(1990)でさらに議論されている。

原核生物内でのタンパク質発現は、融合又は非融合いずれかのタンパク質の発現を支配する構成的又は誘導可能なプロモーターを含むベクターを用いて、E.coliにおいて最も頻繁に行われている。融合ベクターは、コードするタンパク質、通常は組換えタンパク質のアミノ末端、にいくつかのアミノ酸を付加する。これらの融合ベクターは典型的に3つの目的を果たす：1)組換えタンパク質発現を増加する目的；2)組換えタンパク質の可溶性を高める目的；及び3)親和精製におけるリガンド（例えば、ヘキサヒスチジン・タグのようなアフィニティータグ）として作用することにより、組換えタンパク質の精製を促進させる目的。E.coliにおける組換えタンパク質発現を最大限にするための一つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク分解性切断する能力に障害のある宿主細菌内で、前記タンパク質を発現させることである(Gottesman,S.,Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif.(1990)119-128)。もう一つの戦略は、発現ベクターに挿入する核酸の核酸配列を、各アミノ酸に対する個々のコドンがE.coliにおいて優先的に用いられるものとなるように、改変することである(Wada et al.,(1992)Nuc.Acids Res.20:2111-2118)。本発明の核酸配列の前記改変は、標準的なDNA合成技術によって行うことができる。

【0014】

ベクターDNAは、従来のトランスフォーメーション又はトランスフェクション技術によって、原核細胞又は真核細胞に導入することができる。本明細書で用いられる「トランスフォーメーション」及び「トランスフェクション」という用語は、本技術分野において認知されている、外来性の核酸（例えばDNA）を宿主細胞に導入するための種々の技術を指すことを意図し、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション又はエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞にトランスフォーム又はトランスフェクションするための適切な方法は、Sambrook等(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Edition,Cold Spring Harbor Laboratory press(1989))及び他の実験用マニュアルにおいて見出すことができる。

タンパク質発現においては頻繁に、いわゆる封入体が形成される。NS2/3プロテアーゼは、例えば、宿主細胞を溶菌して封入体から組換えNS2/3プロテアーゼを回収することによって、宿主細胞より単離され得る。封入体は、無処理のタンパク質又はポリペプチドの、非天然様の高次構造凝集物である（Current Protocols in Protein Science(1997)John Wiley&Sons Incを参照）。封入体からタンパク質を抽出する方法の多くの例が存在し、Protein ScienceのCurrent Protocolsにおいて議論されている。培養中の原核細胞又は真核細胞のような本発明の宿主細胞は、本発明のNS2/3プロテアーゼを産生するのに用いることができる。

従って、本発明はさらに、宿主細胞を培地中で培養することを含む。前記宿主細胞は、NS

10

20

30

40

50

2/3プロテアーゼをコードする核酸配列のコード領域を有する発現ベクターを含有し、結果として、折り畳まれていない又は不適切に折り畳まれている不活性型組換えNS2/3プロテアーゼを封入体中に産生する。宿主細胞の溶菌液を作製するために、前記宿主細胞は溶菌緩衝液を用いて溶菌される。宿主細胞溶菌液中の封入体は、低速の遠心分離によって前記溶菌液より回収される。好ましくは、溶菌緩衝液が約0.1%のトライトンX-100を含む。その後、前記封入体は、抽出緩衝液を用いて選択的に抽出される。前記抽出緩衝液は、約2%のトライトンX-100及び2 Mの尿素を含むのが好ましい。好ましくは、溶菌緩衝液及び抽出緩衝液の両方に、DTT及びTCEPからなる群より選択される還元試薬を含む。

【0015】

第一態様のもう一つの側面では、不活性型NS2/3プロテアーゼを含む封入体は、上述宿主細胞溶菌液より低速の遠心分離によって得られたペレットから選択的抽出をした後、それに続く低速の遠心分離によって単離される。前記単離された封入体は十分な濃度のカオトロピック試薬を用いて処理され、可溶性の不活性型NS2/3プロテアーゼが作製される。前記カオトロピック試薬は、グアニジン、グアニジン-HCl及び尿素からなる群より選択されるのが好ましい。さらに好ましくは、前記カオトロピック試薬はグアニジン-HClである。前記十分な濃度は4 M～9 Mであるのが好ましい。さらに好ましくは、グアニジン又はグアニジン-HClが4～8 Mの濃度であり、最も好ましくは6 Mである。好ましくは、尿素が6～9 Mの濃度であり、さらに好ましくは8 Mである。

あるいは、真核細胞から分泌させるために、そのアミノ末端を非相同シグナル配列に操作可能に連結させることにより、組換えNS2/3プロテアーゼを細胞外タンパク質として産生させることもできる。この場合、組換えNS2/3プロテアーゼは、前記細胞が培養されている培地から回収することができる。

第一態様のもう一つの側面では、アフィニティークロマトグラフィーを用いて可溶性の不活性型NS2/3プロテアーゼを封入体から単離することを可能にするために、アフィニータグを含むように構築したNS2/3プロテアーゼを用いることができる。このようなアフィニータグ、及び、それに対応するリガンドは、この技術分野においてよく知られている。

【0016】

第一態様の好ましい側面の一つでは、LDA0は臨界ミセル濃度以上で用いられる。さらに好ましくは、LDA0が0.003%～1%の濃度である。最も好ましい側面においては、LDA0は0.03%～1%の濃度で用いられる。理論に縛られることなく、本発明者はリフォールディング（ゲル濾過）緩衝液中に存在するLDA0がリフォールディングのために必要とされるが、酵素のシス切断のためには不十分であると信じている。

第一態様の工程b)の好ましい側面の一つでは、カオトロピック試薬又は極性添加物は、グアニジン、グアニジン-HCl、尿素及びアルギニン-HClからなる群より選択される。さらに好ましくは、グアニジン-HCl又はアルギニン-HClが用いられる。最も好ましくは、アルギニン-HClが用いられる。

第一態様の工程b)の好ましい側面の一つでは、カオトロピック試薬又は極性添加物が0.25 M～2Mの濃度で用いられるのが好ましい。さらに好ましい側面では0.5M～1Mの濃度で用いられ、最も好ましくは最終濃度0.5Mである。

もう一つの好ましい側面において、還元試薬はTCEP及びDTTからなる群より選択される。前記還元試薬は最終濃度0～100 mMで存在するのが好ましく、さらに好ましくは1 mM～10 mMである。最も好ましくは、前記還元試薬が最終濃度5 mMで存在することである。

第一態様の好ましい側面の一つでは、上述リフォールディング方法が透析又はゲル濾過によって行われ、精製NS2/3プロテアーゼを得る。重要な側面の一つでは、可溶性の不活性型NS2/3プロテアーゼは、ゲル濾過を用いてリフォールディングされる。用いられる溶離緩衝液はLDA0、アルギニン-HCl及び還元試薬を含み、前記可溶性の不活性型NS2/3プロテアーゼは、NS2/3プロテアーゼをリフォールディングするのに十分な時間、溶離液中に保持される。主要な画分の収集は、高度に精製された酵素の回収を可能にする。

【0017】

II. 活性化の方法

本発明の第二態様によれば、以下を含む活性型NS2/3プロテアーゼの作製方法を提供する：

c) 工程b)で得られた可溶性の不活性型NS2/3プロテアーゼを活性化物質を含む媒体に添加して、NS2/3プロテアーゼの自己切断を誘起すること。

第二態様の好ましい側面では、活性化物質はグリセロール、及び、CHAPS、トライトンX-100、NP-40及びn-ドデシル-β-D-マルトシドのような界面活性剤からなる群より選択される。

本発明のこの第二態様の別法として、以下を含む活性型NS2/3プロテアーゼを作製する方法が提供される。

c) 工程b)で得られたリフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼを、活性化界面活性剤を含む媒体中に希釈して、前記NS2/3プロテアーゼの自己切断を誘起すること。好ましくは、NS2/3プロテアーゼ希釈後に残存するLDA0が、0.25%より少ない最終濃度である。さらに好ましくは、前記LDA0が最終濃度0.1%以下に希釈される。前記LDA0が最終濃度0.05%より少なく希釈されるのが、最も好ましい。

好ましくは、活性化界面活性剤がCHAPS、トライトンX-100、NP-40及びn-ドデシル-β-D-マルトシドより選択され得る。さらに好ましくは、活性化界面活性剤がCHAPS又はn-ドデシル-β-D-マルトシドである。

好ましくは、活性化界面活性剤が約0.1%～約3%の最終濃度である。さらに好ましくは、活性化界面活性剤が約0.1%～約1%の最終濃度である。最も好ましくは、活性化界面活性剤が最終濃度0.5%である。

活性化界面活性剤に加えてグリセロールを添加することもでき、リフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼを活性化するのに役立つ。好ましくは、グリセロールが0%～60%の最終濃度で存在し得る。さらに好ましくは、グリセロールが10%～50%の最終濃度で存在し得る。最も好ましくは、グリセロールが最終濃度30%で存在する。

好ましい態様で重要なのは、活性化のために用いられる緩衝液又は活性化/切断媒体中に、リフォールディング工程のために必要とされるよりも低い濃度であっても、還元試薬が依然存在することである。還元試薬はTCEP及びDTTからなる群より選択され得る。さらに好ましくは、還元試薬がTCEPである。

好ましくは、還元試薬が1 mM～100 mMの最終濃度である。さらに好ましくは、還元試薬が1 mM～10 mMの最終濃度である。より好ましくは、還元試薬が最終濃度1 mMである。

【0018】

III. NS2/3プロテアーゼ活性の測定方法

本発明の第三態様の好ましい側面によれば、以下を含む精製NS2/3プロテアーゼの自己切断活性を測定する方法が提供される：

c) 工程b)で得られるリフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼを活性化界面活性剤を含む緩衝液中に、NS2/3プロテアーゼが自己切断するのに十分な時間インキュベートすること；及び

d) 自己切断の指標として、残存する未切断NS2/3プロテアーゼ、切断生成物、又はそのフラグメントの有無を測定すること。

好ましくは、リフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼが、上述のアッセイが行われる前に、ゲル濾過を用いてリフォールディング及び精製されることである。

好ましくは、活性化界面活性剤がCHAPS、n-ドデシル-β-D-マルトシド、NP-40及びトライトンX-100である。さらに好ましくは、活性化界面活性剤が0.1%～3%の濃度のn-ドデシル-β-D-マルトシド(DM)である。さらに好ましくは、活性化界面活性剤が約0.1%～約1%の濃度のn-ドデシル-β-D-マルトシドである。さらに最も好ましくはDMが最終濃度0.5%である。

【0019】

さらにグリセロールのような活性化物質を加えることもでき、リフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼの活性化に役立つ。好ましくは、グリセロールが0%～60%の最

10

20

30

40

50

終濃度で存在し得る。さらに好ましくは、グリセロールが10%～50%の最終濃度で存在し得る。最も好ましくは、グリセロールが最終濃度30%である。

好ましくは、NS2/3プロテアーゼが切断緩衝液中に少なくとも1時間、15℃～30℃でインキュベートされる。さらに好ましくは、NS2/3プロテアーゼが切断緩衝液中に少なくとも1時間、15℃～25℃でインキュベートされる。最も好ましくは、NS2/3プロテアーゼが切断緩衝液中に少なくとも1時間、室温で（約23℃）インキュベートされる。

第三態様のもう一つの側面は、NS2/3プロテアーゼを変性させることによって、切断反応を停止する。さらに好ましくは、NS2/3プロテアーゼが熱によって変性させられる。最も好ましくは、自己切断を停止するために、NS2/3プロテアーゼがSDSを用いて変性させられる。

10

切断生成物は、NS2タンパク質又はNS3プロテアーゼであるのが好ましい。NS2タンパク質又はNS3プロテアーゼの量、又は、それらのフラグメントの量は、当業者に知られる多くの手法のどれか一つを用いて測定され得る。前記手法の具体例は、酵素活性、免疫ブロット染色、化学発光、蛍光又はクマシー染色である。別法として、切断の指標として残存する未切断NS2/3プロテアーゼの量を測定することもできる。

【0020】

IV. 阻害剤をスクリーニングする方法

第四態様では、本発明は、以下を含む活性型NS2/3プロテアーゼの自己切断活性の潜在的阻害剤をスクリーニングするためのアッセイを提供する：

c) 潜在的阻害剤の存在下、又は非存在下において、工程b)で得られるリフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼのサンプルを、活性化界面活性剤を含む緩衝液中に十分な時間インキュベートすること；

20

d) 切断生成物の量、又は、それらのフラグメントの量を測定すること；及び

e) 潜在的阻害剤の存在下又は非存在下において、切断生成物又はそれらのフラグメントの量を比較すること。

活性型NS2/3プロテアーゼのサンプルは、候補薬物又はリガンドとともに適切な媒体中に約1時間インキュベートされるのが、好ましい。

好ましい側面では、切断生成物が、NS2タンパク質又はNS3プロテアーゼのどちらかである。好ましくは、NS2タンパク質又はNS3プロテアーゼいずれかの有無、又はそれらのフラグメントの有無を、酵素活性、抗NS3プロテアーゼ抗体又は抗ヒスチジン・タグ抗体の使用を含む免疫ブロット分析を用いて解析する。別法として、切断の指標として残存する未切断NS2/3プロテアーゼの量を測定することもできる。

30

【0021】

V. NS2/3プロテアーゼ、ポリペプチド及び短縮片/核酸分子

好ましくは、NS2/3プロテアーゼが、完全長NS2/3プロテアーゼ810-1206又はその短縮片である。さらに好ましくは、NS2/3プロテアーゼがアミノ酸815～アミノ酸906に対応している第一アミノ酸を有したままで、N末端が短縮される。一層好ましくは、アミノ酸866～906に対応している第一アミノ酸を有するN末端短縮タンパク質である。なお一層好ましくは、アミノ酸890～904に対応している第一アミノ酸を有するN末端短縮タンパク質である。最も好ましくは、完全長NS2/3プロテアーゼの残基904～1206を最少アミノ酸配列として有するNS2/3短縮タンパク質が提供される。非常に好ましくは、配列番号10によって番号付けられるアミノ酸残基904-1206からなる、短縮NS2/3タンパク質である。

40

本発明の第五態様では、以下のものからなる群より選択される、短縮NS2/3プロテアーゼからなる活性型NS2/3ポリペプチドが提供される：配列番号2、4、10、11、12、13、14及び15によって定義する配列。好ましくは、NS2/3プロテアーゼは、以下のものからなる群より選択される配列を有する：配列番号4、10、11、12及び15。さらに好ましくは、NS2/3プロテアーゼは、配列番号4又は10に示す配列、又は、それらと機能的に等価な変異体を有する。最も好ましくは、NS2/3プロテアーゼは、配列番号4又は10に示す配列を有する。本発明の第五態様のもう一つの側面によれば、以下のものからなる群より選択されるリフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼが提供される：完全長NS2/3プロテアー

50

ぜ、配列番号2、4、10、11、12、13、14及び15によって定義する配列。さらに好ましくは、配列番号4又は10によって定義するリフォールディングされた不活性型NS2/3プロテアーゼが提供される。

第五態様のさらに別の側面によれば、配列番号2、4、10、11、12、13、14及び15によって定義するポリペプチドに比較して、全長に渡って90%の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが提供される。さらに好ましくは、配列番号4又は10によって定義するポリペプチドに比較して、全長に渡って90%の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが提供される。

第五態様のもう一つの側面では、配列番号2、4、10、11、12、13、14及び15のそれぞれに示すアミノ酸配列をコードする核酸分子が提供される。

10

配列番号1から一部残基を単離し、コードされるNS2/3プロテアーゼの890-1206の一部を例えば上述のような宿主細胞中で組換え発現させ、精製及びリフォールディングに続いて前記一部の自己切断活性を評価することによって、NS2/3プロテアーゼと機能的に等価な変異体をコードする核酸フラグメントを調製することができる。

【0022】

本発明の核酸分子は、標準的な分子生物学的手法、及び、本明細書に規定される配列情報を用いることによって、単離することができる。アミノ酸890-1206をコードしている残基の全部又は一部を含む核酸分子は、適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、単離することができる。例えば、mRNAは細胞から単離することが可能であり(例えば、Chirgwin等のグアニジニウム-チオシアネート抽出方法((1979)Biochemistry18:5294-5299)によって)、cDNAは逆転写酵素(例えば、Gibco/BRL,Bethesda,Md.から入手可能なMoloney MLV逆転写酵素、又は、Seikagaku America,Inc.,St.Petersburg,Fla.から入手可能なAMV逆転写酵素)を用いて調製することが可能である。PCR増幅のための合成オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1に示すヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。本発明の核酸分子は、標準的なPCR増幅方法に従い、鋳型としてcDNA又は代替的にゲノムDNA、及び適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅することができる。このように増幅された核酸は、適切なベクターにクローン化されDNAシーケンシング解析によって特徴付けることができる。さらに、NS2/3プロテアーゼのヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば自動DNA合成装置を用いるような、標準的な合成方法によって調製することができる。

20

30

ウイルス集団に存在し得るNS2/3プロテアーゼ配列の自然発生変異体に加えて、更にアミノ酸890~1206をコードするヌクレオチド配列中の変異によって誘起され得る変更は、それによってコードするタンパク質のアミノ酸配列に変更をもたらし、NS2/3プロテアーゼの機能的活性を変えることも変えないこともあることを、当業者であれば理解するであろう。例えば、“本質的でない”アミノ酸残基にアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号1の配列において行われ得る。“本質的な”アミノ酸残基は機能的活性に必要とされるのに対し、“本質的でない”アミノ酸残基は、NS2/3プロテアーゼの機能的活性を変えることなしに、NS2/3プロテアーゼの完全長配列(例えば、配列番号2の配列)から変更することが可能な残基である。

従ってもう一つの側面では、本発明は、NS2/3プロテアーゼ活性に必要な不可欠なアミノ酸残基における変更を含むNS2/3プロテアーゼをコードする核酸分子に関する。このようなNS2/3プロテアーゼ変異体は、アミノ酸配列が配列番号10と異なり、そのプロテアーゼ活性を欠損している。本発明において用いられ得るこのような変異体NS2/3プロテアーゼの具体例は、His-952がAlaによって置き換わっているNS2/3プロテアーゼ[904-1206]H952A(配列番号16)、NS2タンパク質とNS3タンパク質間の切断部位残基における欠失に対応するNS2/3プロテアーゼ[904-1206] Δ L1026A1027(配列番号17)、及び、Cys993がAlaに置き換わっているNS2/3プロテアーゼ[904-1206]C993A(配列番号18)である。

40

【0023】

(実施例)

本発明は以下の非限定的な実施例によって、さらに詳しく説明される。

50

材料及び方法略語：

Ala：アラニン

°C：セルシウス度

CHAPS：3-[(3-コラミドプロピル)ジメチル-アンモニオ]-1-プロパンスルホネート

CMC：臨界ミセル濃度

DHFR：ジヒドロ葉酸レダクターゼ

DNase：デオキシリボヌクレアーゼ

DTPA：N,N-ビス[2-(ビス[カルボキシメチル]アミノ)エチル]-グリシン

DTT：ジチオスレイトール

EDTA：エチレンジアミン四酢酸

g：グラム

g：相対遠心力

h：時間

HCV：C型肝炎ウイルス

Hepes：4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジン-エタンスルホン酸

His：ヒスチジン

His₆：ヘキサヒスチジン・タグ

HMK：心筋キナーゼ

IPTG：イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド

kDa：キロダルトン

LDAO：ラウリルジエチルアミノオキシド

Leu：ロイシン

M：モル濃度

MBP：マルトース結合タンパク質

min：分

mL：ミリリットル

mM：ミリモル濃度

Octyl-POE：n-オクチルペンタオキシエチレン

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応

SDS-PAGE：ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動

st：Schmidt&Skerra, Plot.Engineering(1993)6;109-122で記述される

ストレプトアビジン・タグ

TCEP：トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンハイドロクロライド

Tris：トリス[ヒドロキシメチル]アミノメタン

μg：マイクログラム

μm：ミクロン

WT：野生型

w/v：単位体積当りの質量

【0024】

材料

界面活性剤CHAPS及びトライトンX-100はSigmaから、LDAOはCalbiochemから、n-ドデシル-β-D-マルトシドはAnatrace Incから、NP-40はRocheから、及びオクチル-POEはBachemから入手した。還元試薬DTT及びTCEPはそれぞれ、Pharmacia Biotech及びPierceから入手した。アルギニンハイドロクロライド、グリセロール、Hepes、イミダゾール及び塩化マグネシウムは全て、Sigmaから入手した。グアニジン-HCl及びTrisはGibco BRLから、IPTG及び尿素はRocheから入手した。塩化ナトリウム及び塩化亜鉛はそれぞれ、Fisher及びAldrichから入手し、EDTAはAmbionから、DNaseはPharmacia Biotechから入手した。制限酵素類はPharmacia Biotechから入手した。E.coli XL-1Blue細胞はStratageneから、BL21(DE3)pLysS細胞はNovagenから入手した。FLAG（商標）及び抗FLAG抗体によって認識されるペプチ

10

20

30

40

50

ド配列の対応配列は、Eastman Kodak Companyから入手した。HMK_{tag}は特異的タンパク質キナーゼHMK（心筋キナーゼ）に対する認識配列の5残基ペプチド(RRASV)であり、これによってリン酸化部位が導入される(Blonar,M.及びRutter,W.(1992)Science256:1014-1018)。

【0025】

実施例1

NS2/3完全長構築物：

完全長(810-1206)NS2/3配列は、2つのオリゴヌクレオチドプライマー、N末端側に対する5'-CCATGGACCGGGAGATGGCT-3'（配列番号5）、C末端側に対する5'-GGATCCTTAACCACTGCGGGTGACGCCAAGCGCTACTAGTCCGCATGGTAGTTTCCAT-3'（配列番号6）を用いて、HCV1b-40配列(Boehringer-Ingelheim(Canada),LtdのW0 99/07733)からPCRによって増幅した。この方法は、5'末端にNcoI認識部位、及び3'末端にBamHI認識配列、これに続けてストレプトアビジン・タグ“st” (Schmidt&Skerra,Prot.Engineering(1993)6;109-122)を導入し、配列番号1の核酸分子（図1）を与える。前記PCR産物を、InvitrogenのTAクローニング（登録商標）キットを用いてベクターpCR3（商標）に挿入した。その後この挿入片を、EcoRIを用いて切断し、平滑末端を作成するためにクレノウ(Klenow)処理し、NcoIを用いて部分的に切断することによって、細菌発現ベクターpET-11d(Novagen)に移した。この構築物をpET-11d-NS2/3stと命名した。このDNAをXL-1Blue E.coli細胞にトランスフォームし、単離して、シーケンシングを行った。その後このDNAを、タンパク質産生のためにE.coli BL21(DE3)pLysSに移した。

【0026】

実施例2

NS2/3のN末端欠失変異体：

N末端欠失変異体815^{*}-1206、827-1206、855-1206、866-1206、904-1206及び915-1206は、5'末端及びNS3ドメイン中のアミノ酸1083にNcoI認識部位を設計した鋳型pET-11d/NS2/3から得られた。この鋳型をNcoIで切断した後、その3'末端フラグメント及び前記ベクターをゲル精製した。前記変異体は、NS2/3配列を含む適切な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRによって、アミノ酸1083までの所望するN末端残基をコードするヌクレオチドから得られた。この得られた挿入片を前記ゲル濾過フラグメントに結合するために、前記プライマーにも5'末端にNcoI認識部位を導入した。その後このDNAをE.coli XL-Blue細胞にトランスフォームし、単離して、シーケンシングを行った。最終的に前記DNAを、タンパク質産生のためにE.coli BL21(DE3)pLysSに移した。発現はSDS-PAGEによって確認した（図2A、2B、2C）。

*第一メチオニンが本来の配列の一部であるため、このフラグメントの番号付けは誤っており、従って"814"と番号付けられるべきである。よって、"815"で始まる短縮片に対する全ての言及を、配列番号11に正しく表示されるように"814"として読むべきである。

【0027】

実施例3

NS2/3 N末端短縮変異体4K-6H(904-1206)st-4K（配列番号4）：

この構築物に、4つのリジンをN末端及びC末端に、かつ、ヘキサヒスチジン・タグをN末端に付加した。この構築物は、PCR及び鋳型pET-11d/NS2/3stを2つのプライマーとともに用いて得られ、この鋳型はタグのための配列、及び、アミノ酸残基904-1206をコードするヌクレオチドからのNS2/3配列を含む。前記プライマーは又NdeI及びBamHI認識部位を、それぞれ5'及び3'末端に導入した。この挿入物をpET-11dにクローン化して、pET-11d 4K-6H-NS2/3(904-1206)-st-4K（配列番号3）と命名した。このDNAをE.coli XL-1Blue細胞にトランスフォームして、単離し、シーケンシングを行った。このDNAを、タンパク質産生のためにE.coli BL21(DE3)pLysSに移した。

短縮構築物904-1206のために、4つのプライマー及び2つの連続したPCR反応を用いた。第一のPCR反応に用いたプライマーは、N末端側に対しての

GCTCGAGCATCACCATCACCATCACAAGTAGTGCAGGCATAACCAAA（配列番号7）、及びC末端側に対して

10

20

30

40

50

の

AACAATGGATCCTTACTTTTTCTTTTACCACCGAACTGCGGGTG（配列番号8）である。第二のPCR反応に用いたプライマーは、N末端側に対しての

ACCTGCCATATGAAAAAGAAAAAGCTCGAGCATCACCATCACCAT（配列番号9）、及びC末端側に対しての

AACAATGGATCCTTACTTTTTCTTTTACCACCGAACTGCGGGTG（配列番号8）である。

【0028】

実施例4

酵素の発現及び産生

N末端にヘキサヒスチジン・タグを有するHCV NS2/3プロテアーゼ遺伝子型1b[904-1206]（図3）を、pET-11d発現ベクターにクローン化した。タンパク質の可溶性を高めるために4つのリジン残基をN末端とC末端の両方に付加し、同時にストレプトアビジン・タグをC末端に付加して、配列番号3の核酸分子を得た。1 mM IPTGで37℃、3時間誘導して、E.coli BL21(DE3)pLysS中にプロテアーゼを発現させた。典型的な4Lの発酵物から、湿った細胞ペーストおよそ20 gが得られた。この細胞ペーストは-80℃で保存することができる。

実施例5

封入体の抽出

23℃での解凍に続き、前記細胞を100 mM Tris、pH8.0、0.1%のトライトンX-100、5 mM EDTA、20 mM MgCl₂、5 mM DTTからなる溶菌緩衝液(5 mL/g)中でホモジナイズした。続いて4℃で15分間DNase処理(20 μg/mL)を行い、22,000xg、4℃で1時間遠心分離を行った。この細胞ペレットを100 mM Tris、pH8.0、2% トライトンX-100、5 mM EDTA、2 M 尿素、5 mM DTT中で(5 mL/g)2回ホモジナイズすることによって洗滌し、22,000xg、4℃で30分間遠心分離を行った。最後に細胞を100 mM Tris、pH8.0、5 mM EDTA、5 mM DTTで洗滌した。22,000xg、4℃、30分間の遠心分離によってペレットとして封入体を回収した。

【0029】

実施例6

a)封入体の抽出

封入体を可溶化するために、細胞ペレットを100 mM Tris、pH 8.0、6 Mグアニジン-HCl、0.5 M NaClからなる抽出緩衝液(4 mL/g)中に懸濁して、23℃で1時間、前記緩衝液中に維持した。その後、この懸濁液を125,000xg、4℃で30分間遠心分離した。得られた上清を0.22 μmのフィルターを通して濾過した。不純物を除いた封入体抽出物は、必要とするまで-80℃で保存することができる。

b)封入体からの4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4K単離

4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4K（配列番号4）を単離するために、前記封入体抽出物を100 mM Tris、pH8.0、6 Mグアニジン-HCl、0.5M NaCl中に2倍希釈（約1 mg/mL）し、ファルマシアHi-Trap Ni²⁺-キレート化カラムに加えた。単離したタンパク質は、50~500 mMイミダゾールの直線グラジエントにおいて典型的に250 mMイミダゾールとともに溶離された。主要なピークに対応している画分を保存した。

【0030】

実施例7

ゲル濾過カラム上でのリフォールディング及び精製

単離した封入体を前処理するために5 mM TCEP、5 mM ZnCl₂を加えた。15分間、23℃でインキュベートしてから、このサンプルをファルマシアSuperose 12ゲル濾過カラムに装荷した。そして4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4KをTris 50 mM、pH 8.0、0.5 Mアルギニン-HCl、1% LDAO、5 mM TCEP中に溶離させて、リフォールディングされたNS2/3プロテアーゼを得た。主要なピークに対応する画分のみ（図4）を集めて保存した。この状態下で、自己切断は検出されなかった。この精製しリフォールディングされた不活性型酵素を溶離緩衝液中-80℃で保存した。典型的にはE.coli培養液1リットルあたり、約7 mgのリフォールディングされたNS2/3プロテアーゼが得られた。

NS2/3プロテアーゼ自己切断の問題を克服するために、最初に4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4

10

20

30

40

50

KのHis952Ala変異体（配列番号16）又は Δ Leu1026-Ala1027変異体（配列番号17）のいずれかを用いて、リフォールディング状態を判定した。これら変異体は両方とも、自己触媒活性を欠いている。リフォールディングされた酵素の段階希釈液を内部消光蛍光発生基質アントラニリル-DDIVPAbu[C(0)-O]AMY(3-NO₂)TW-OH（配列番号19）とともに、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、30%グリセロール、1 mg/mL BSA、及び1 mM TCEP中に30又は60分間、23°Cでインキュベートすること（WO 99/07733に詳細に記述されており、参照により本明細書にこれを含むものとする）により、NS3プロテアーゼの活性に基づいて（図4）リフォールディングを間接的に評価した。タンパク質分解活性は、前記基質の切断に付随する蛍光変化、及び、蛍光生成物アントラニリル-DDIVPAbu-COOH（配列番号20）の出現を、BMG Galaxy 96ウェルプレートリーダー（励起フィルター：355 nm；発光フィルター：485 nm）

10

上でモニターした。
4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kを産生し、同じプロトコールに従って、精製及びリフォールディングし、95%より高い純度の酵素を得た。NS3プロテアーゼ活性によって、適切なリフォールディングを確認した（図4、点線）。

【0031】

実施例8

リフォールディング後の活性の確認

シス-切断アッセイ

4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kの自己切断反応は、50 mM Hepes、pH 7.0、50%(w/v)グリセロール、0.1% CHAPS（図6）又は1% n-ドデシル- β -D-マルトシド（図7、8）（NP-40及びトライトンX-100を使用することもできる）及び1 mM TCEPからなる切断緩衝液に酵素を加えることによって開始させた。このアッセイ混合物を3時間、23°Cでインキュベートした。この反応は、SDS存在下、酵素の熱変性によって停止させた。NS2/3接合部における切断は、SDS-PAGE(15%)、及び、自家作製したNS3プロテアーゼポリクローナル抗体又は商業的に入手可能なヘキサヒスチジン・タグポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc)のいずれかを用いる免疫ブロット分析によって、モニターした（図5）。

20

実施例9

不均一時間分解蛍光アッセイ

最初にNS2/3プロテアーゼをニッケル-キレート化プレート上に固定する（図10）。それから、ユーロピウム標識抗NS2又は抗FLAG_{tag}抗体を加える。当業者であれば、タンパク質の標識に対して多くのタグが利用可能であることを理解するだろう。この実施例では、FLAG(商標)及びHMKを用いる。前記抗体の結合に続いて、過剰量の抗体を取り除くために洗滌する工程を行った。そして、切断緩衝液の添加によって自己切断反応を開始させる。適切なインキュベーション時間の後このアッセイ混合物を第二のプレートに移し、ユーロピウム標識生成物に付随する時間分解蛍光の測定によって、切断をモニターする。NS2/3プロテアーゼの切断は、ニッケル-キレート化プレートに結合する非プロセッシング酵素によって生ずる時間分解ユーロピウム蛍光シグナルの減衰によって、モニターすることもできる。別法としては、NS2/3プロテアーゼを含むStrep-tag(登録商標)を活性化緩衝液中にインキュベートして、自己切断反応を進行させる（図14）。そして、得られたStrep-tag NS3フラグメント、及び、未切断Strep-tag NS2/3プロテアーゼをストレプトアビジン-コートしたプレート上に固定する。ユーロピウム標識抗NS2抗体を加えて、結合するユーロピウム標識抗体に付随する時間分解蛍光を測定する。

30

40

【0032】

アッセイプロトコール：

自己切断反応

96ウェルポリプロピレンプレートに、i)試験化合物（潜在的阻害剤）の存在を伴う又は伴わないアッセイ緩衝液20 μ L（50 mM Hepes、pH 7.5、30%グリセロール、1 mM TCEP）、及びii)実施例7に従って精製したNS2/3プロテアーゼ10 μ L（最終濃度200 nM）を順次加える。活性化緩衝液20 μ L（50 mM Hepes、pH 7.5、30%グリセロール、0.5% n-ドデシル- β -D-マルトシド、1 mM TCEP）の添加によって自己切断反応を開始させ、1.5時間、30°Cで

50

進行させる。

ストレプトアビジンプレートへの結合

96ウェルホワイトストレプトアビジン-コートプレート(Pierce)上で、自己切断反応混合物をアッセイ緩衝液(50 mM Hepes、pH 7.5、30%グリセロール、1 mM TCEP)中に5倍希釈する。23°Cで1時間インキュベートしてから、このプレートを0.05%Tween-20、2 Mグアニジン-HClを含むPBSで洗滌する。

Eu⁺³ 標識抗NS2の結合

96ウェルホワイトストレプトアビジン-コートプレート¹に、0.05% Tween-20、0.3% BSA、1 μMビオチン、100 μM DTPAを含むPBS中にEu⁺³ 標識抗NS2を最終濃度35 nMで加える。23°Cで1時間インキュベートしてから、このプレートをDELTA洗滌緩衝液(Perkin Elmer Wallac)で洗滌する。最後にエンハンスメント溶液(Perkin Elmer Wallac)を加え、Wallac 1420 VICTOR² マルチ-ラベルカウンターで時間分解蛍光を測定する。

¹注釈：ニュートルアビジンプレートを用いることもできる。

【0033】

実施例10

均一時間分解蛍光アッセイ

NS2/3プロテアーゼを、一方の端を蛍光ユーロピウムキレート剤で標識し、もう一方の端をユーロピウム蛍光消光剤で標識する(図11)。例えば、ユーロピウム標識抗NS2又は抗FLAG_{tag}抗体を蛍光部分として用い、一方ユーロピウム蛍光消光剤を酵素又は潜在的NS3プロテアーゼ阻害剤のいずれかに共有結合させる。この酵素反応は、切断緩衝液の添加によって開始させる。自己切断によって、ユーロピウムキレート剤及び消光剤が分離して、時間が経つにつれて時間分解ユーロピウム蛍光シグナルが増加する。

実施例11

蛍光偏光アッセイ

蛍光成分で標識した強力なNS3プロテアーゼ阻害剤のような蛍光プローブを、NS2/3プロテアーゼを含む溶液に加える(図12)。自己切断反応は、切断緩衝液の添加によって開始させる。自己切断によるプローブの蛍光偏光の変化を経時的にモニターする。別法として、NS2/3プロテアーゼを固定化したニッケル-キレート化プレートを用いることもできる。酵素を蛍光プローブとともにインキュベートするのについて、切断緩衝液の添加によって自己切断反応を開始させる。適切なインキュベーション時間の後、前記プローブの蛍光偏光の変化を測定することによって、切断をモニターする。

【0034】

実施例12

放射測定アッセイ

最初に、NS2/3プロテアーゼをニッケル-キレート化プレートに固定する(図13)。プロテインキナーゼA及び放射能標識した基質を用いて、HMK_{tag}をリン酸化する。リン酸化反応の完了後、このプレートを洗滌し、切断緩衝液の添加によって自己切断反応を開始させる。適切なインキュベーション時間の後、アッセイ溶液中に溶出した放射能標識生成物の量、又は、放射能標識非プロセッシングNS2/3プロテアーゼの量のいずれかを測定することによって、前記反応を定量化する。別法として、リン酸化反応を最初に行い、続いてニッケル-キレート化プレート上へ固定化することもできる。

実施例13

NS2/3プロテアーゼ阻害

NS2/3プロテアーゼ切断部位由来のペプチドを、潜在的競合基質として評価した(表1)。NS2/3プロテアーゼ切断部位由来のペプチド及びNS4A由来のペプチドは、標準的な固相方法論を用いて自家合成したもの、又はマルチプル(multiple)ペプチドシステム(San Diego, CA)によって作製した。種々の濃度のペプチドを、0.54 μMのNS2/3プロテアーゼとともに50 mM Hepes、pH 7.0、50%(w/v)グリセロール中に30分間、23°Cでプレ・インキュベートした。自己切断反応は、n-ドデシル-β-D-マルトシドを最終濃度0.5%まで加えることによって開始させた。最終的なDMSO含有量は、決して5%(v/v)を超えなかった。得られた

10

20

30

40

50

混合物を3時間23℃でインキュベートした。反応を停止させて、定量した。NS2/3プロテアーゼ切断部位由来のペプチドは、全くトランスに切断されなかった（データ表示せず）。NS2/3接合部のP10-P10'残基に渡るペプチド（ペプチド1）は270 μM の IC_{50} で自己切断を阻害したのに対し、P6-P6'残基に渡るペプチド基質（ペプチド4）は作用が弱く、630 μM の IC_{50} であった。対応する切断部位生成物の中で、最も活性があったのはペプチド1のN末端生成物であるペプチドSFEGQGWRL（ $\text{IC}_{50}=90$ μM 、配列番号21）であった。

【0035】

【表1】

表1

ペプチド^aによるNS2/3自己切断の阻害

ペプチド#	配列	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})^b$
NS2/3プロテアーゼ切断部位由来のペプチド ^c		
1	SFEGQGWRL-APITAYSQQT	270
2	SFEGQGWRL (配列番号21)	90
3	APITAYSQQT	>1000
4	KGWRL-APITAY	630
5	APITAY	1000

^aペプチドは、DMSO中で20 mMの保存溶液として調製した。最終DMSO含有量は決して5%(v/v)を超えなかった。

^bアッセイは、0.54 μM のNS2/3プロテアーゼの存在下で行った。

^cハイフンは、P1とP1'の間の切断部位を示す。

【0036】

（考察）

今日まで、単独又はNS3と連結する天然NS2の生成は、その疎水性の性質によって妨害されてきて、低レベルの発現しか達成されなかった。N末端短縮片の研究によって、NS2/3プロテアーゼ[904-1206]の同定が可能になった（図3）。この短縮片はIPTG誘導によってE.coli中で高レベルに発現し（図2B及び2C、レーン904）、NS3プロテアーゼ切断生成物の存在によって示されるように（図2A及び2C、レーン904）活性型であった。しかしながら、NS2/3プロテアーゼ[904-1206]は封入体として、不溶性画分中のみ回収された。

マルトース結合タンパク質及びチオレドキシンのような可溶性の融合相手の使用は、発現するプロテアーゼの可溶性を増加させることに成功しなかった（データ表示せず）。

0.5 Mアルギニン-HClのような低濃度のカオトロピック試薬又は極性添加物の維持が、リフォールディング処理の間4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4K（図9B、配列番号4）を溶液中に維持するために重要であった。アルギニン-HClは低濃度カオトロピック試薬に匹敵する様式で、タンパク質を僅かに不安定化する極性添加物である。アルギニン-HClはフォールディングする中間体の可溶性を増加させ得ると、仮定されている(Lin,T.Y.et al.(1996)Protein Sci.5:372-381)。

変性緩衝液に代えてリフォールディング緩衝液に置換することによる凝集を減少、及び/又は抑制するために、界面活性剤もリフォールディングに必要とされた。界面活性剤LDAO、n-ドデシル- β -D-マルトシド及びオクチル-POEを、それぞれのCMC値0.03%、0.01%及び0.25%（水における）の濃度以上で、4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kのリフォールディング促進能力について評価した。オクチル-POEの存在下でリフォールディングは検出されなかった。LDAO及びn-ドデシル- β -D-マルトシドは、酵素を効果的にリフォールディングすることが見出された。その一方、そのリフォールディング能力に加えて、n-ドデシル- β -D-マルトシドは4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kの活性化を誘導することが見出された。予想に反して、自己切断を促進することなくリフォールディング及びNS3プロテアーゼ活性の再構成を可能にしたので、LDAOを選択した。最後に本発明者は、酵素のリフォールディングのために、還元試薬（DTTにしるTCEPにしる）の存在が必要であったことを見出している。

【0037】

種々の切断/活性化界面活性剤を、4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kの自己切断促進能力につ

10

20

30

40

50

いて評価した。自己プロセッシングは、実施例7のアッセイ緩衝液にCHAPSを添加して観察した(図6、レーン2~5)。同様な自己プロセッシングをn-ドデシル- β -D-マルトシド、NP-40及びトライトンX-100でも観察したが、0.5%及び1%のn-ドデシル- β -D-マルトシドが優れているようであった。不十分なプロセッシングが、オクチル-P0Eの存在下で観察されたが、一方LDA0ではほとんど観察されなかった(データ表示せず)。切断/活性化界面活性剤に加えて、グリセロールが自己切断を促進することも見出された(図6、レーン1)。興味深いことに、0%のグリセロールでは低レベルの切断が観察されたのに対して、グリセロール及び切断/活性化界面活性剤の両方をアッセイ緩衝液に添加した場合には、実質的に向上した切断が観察された(図6、レーン6)。

リフォールディングの間に用いられるLDA0は、自己プロセッシングを阻害する。そのため自己切断反応は、酵素が適切な切断/活性化緩衝液に希釈され、かつLDA0が約0.25%より低い濃度に希釈されることによってのみ開始させることができる。

NS2/3プロテアーゼの活性を、SDS-PAGE及び免疫ブロット分析によって(図7)、及び、対応するHis952Ala変異体について切断生成物が存在しないことによって(図8)確認した。さらに、強力なNS3プロテアーゼ阻害剤の存在下でも、前記活性に変化が認められなかった(データ表示せず)。最後に、両シス切断生成物のN末端シーケンシングによって、切断がLeu1026とAla1027残基間で起こったことを確認した。

切断部位由来のペプチド基質P10-P10'及びP6-P6'を、潜在的競合基質として評価した。精製NS2/3(904-1206)及び最適化切断緩衝液(50%グリセロール及び0.5% n-ドデシル- β -D-マルトシドを含む)を用いる充分に確立されたアッセイ系で、前記P10-P10'及びP6-P6'ペプチドはそれぞれ270及び630 μ MのIC₅₀でNS2/3のプロセッシングを阻害したが、同じアッセイ条件下でペプチドのトランス切断は観察されなかった(データ表示せず)。この結果は、活性化部位へのペプチド基質の非生産的な結合を示唆する。特に、より短いP10-P1 N末端切断生成物ペプチドは90 μ MのIC₅₀を有する最も優れた阻害剤であったが、一方、対応するC末端生成物は阻害活性を欠いていた。

【図面の簡単な説明】

【図1A】 HCV1b遺伝子型の完全長NS2/3(810-1206)stのヌクレオチド配列(配列番号1)を表す。

【図1B】 図1Aのヌクレオチド配列によってコードされる、完全長NS2/3(810-1206)stのアミノ酸配列(配列番号2)を表す。

【図2】 pET11d発現ベクターでクローン化されたHCV NS2/3プロテアーゼの完全長及びアミノ酸815-915~1206を含むN末端欠失変異体における、N末端短縮片の研究を表す。NS2/3プロテアーゼ構築物は、ウサギ網状赤血球溶解液中in vitroで翻訳された。翻訳された[³⁵S]標識生成物をSDS-PAGE(15%)によって分離し、ホスホリメージャ(PhosphorImager)で視覚化した(A)。NS2/3プロテアーゼ構築物のE.coli発現で、誘導しないもの(レーン-)又は1 mMのIPTGとともに37°Cで2時間誘導したもの(レーン+)を、SDS-PAGE(15%)(B)及び抗NS3ポリクローナル抗体を用いた免疫ブロット分析(C)によって評価した。各転写物に発現したNS2/3プロテアーゼの第一アミノ酸に従って、レーンが番号付けされている。分子量の基準物質及びNS3プロテアーゼの位置を示してある。

【図3】 N末端及びC末端にリジン残基、N末端ヘキサヒスチジン・タグ、及び、C末端ストレプトアビジン・タグ("st")とともにアミノ酸残基904-1206を含むHCV NS2/3プロテアーゼ構築物の概略図である。

【図4】 リフォールディングされた4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4K(配列番号4)をSuperose 12ゲル濾過カラムにかけて得られたクロマトグラムを表す。5 mM TCEP及び5 mM ZnCl₂を精製した封入体に加えると、酵素がリフォールディングされ、Tris 50 mM、pH 8.0、0.5 Mアルギニン-HCl、1% LDA0、5 mM TCEP中に溶離される。実線(—)は280 nmでの吸光度を表し、点線(・・◆・・)は蛍光発生基質アントラニル-DDIVPAbu[C(=O)-O]AMY(3-NO₂)TW-OHを用いて選択した画分でモニターしたNS3プロテアーゼドメイン活性を示す。

【図5】 封入体からの4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kの作製及び精製を、クマシーブルー染色した15%SDS-PAGE(A)、抗NS3ウサギ抗血清を用いた免疫ブロット分析(B)、及び抗His₆

10

20

30

40

50

ウサギ抗血清を用いた免疫ブロット分析(C)によってモニターしたものを表す。レーン1：未精製E.coli抽出物；レーン2～5：封入体(IB)洗液；レーン6～10：Ni²⁺-キレート化カラムでの封入体精製；レーン11：精製した封入体；レーン12：Superose 12ゲル濾過カラムに装荷するもの；レーン13：リフォールディングされた酵素（詳細については実施例を参照）。未処理酵素、及び切断生成物4K-6H-NS2(904-1206)及びNS3(1027-1206)st-4Kを表示する。

【図6】 抗NS3ウサギ抗血清を用いた免疫ブロットによってモニターした、4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kの自己プロセッシング活性に対するグリセロール及びCHAPSの効果を表す。自己切断反応は、種々の量のグリセロール及びCHAPSを含む50 mM Tris、pH 8.0、1 mM TCEP中にリフォールディングした酵素を希釈することによって開始させ、23℃で18時間インキュベートした。レーン1：30%グリセロール、CHAPS無し；レーン2～5：グリセロール無し及び、それぞれ0.1、0.25、0.5又は1.0%のCHAPS；レーン6～9：30%グリセロール及び、それぞれ0.1、0.25、0.5又は1.0%のCHAPS。未処理酵素及びNS3(1027-1206)st-4K生成物を表示する。

10

【図7】 抗NS3ウサギ抗血清(A)及び抗His₆ウサギ抗血清(B)を用いた免疫ブロットによってモニターした、4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kシス切断の時間経過を表す。自己切断反応は、50 mM Hepes、pH 7.0、50%グリセロール(w/v)、1% n-β-D-ドデシルマルトシド、1 mM TCEP中にリフォールディングした酵素を希釈することによって開始させ、23℃で0、1、2、4、6及び24時間インキュベートした。未処理酵素、及び生成物4K-6H-NS2(904-1026)及びNS3(1027-1206)st-4Kを表示する。

20

【図8】 抗NS3抗血清(A)又は抗His₆抗血清(B)を用いた免疫ブロット解析による、4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4KのHis952Ala("H952A")変異体（配列番号16）精製物、及び野生型精製物のNS2-NS3プロテアーゼ活性の比較を表す。自己切断反応を、50 mM Hepes、pH 7.0、50%グリセロール(w/v)、1% n-β-D-ドデシルマルトシド、1 mM TCEP中、23℃で0、2及び24時間行った。24時間のインキュベーションを、界面活性剤がない状態でも行った（レーン24^{*}）。未処理酵素、及び自己切断生成物4K-6H-NS2(904-1026)及びNS3(1027-1206)st-4Kを表示する。

【図9A】 4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kのヌクレオチド配列（配列番号3）を表す。

【図9B】 図9Aのヌクレオチド配列によってコードされる4K-6H-NS2/3(904-1206)st-4Kのアミノ酸配列（配列番号4）を表す。

30

【図10】 不均一時間分解蛍光(TRF)アッセイの形態を説明する図である。

【図11】 均一時間分解蛍光(TRF)アッセイの形態を説明する図である。

【図12】 蛍光偏光アッセイの形態を説明する図である。

【図13】 放射測定アッセイの形態を説明する図である。

【図14】 本発明の精製NS2/3プロテアーゼを用いる別法のTRFアッセイ形態の模式的表示である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd.

<120> Purified Active HCV NS2/3 Protease

<130> 13/082pct

<150> 60/256,031

<151> 2000-12-15

<160> 21

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1230

<212> DNA

<213> HCV

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1230)

<400> 1

atg gac cgg gag atg gct gca tgc tgc gga ggc gcg gtt ttc ata ggt	48
Met Asp Arg Glu Met Ala Ala Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Ile Gly	
1 5 10 15	

ctt gca ctc ttg acc ttg tca cca tac tat aaa gtg ctc ctc gct agg	96
Leu Ala Leu Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys Val Leu Leu Ala Arg	
20 25 30	

ctc ata tgg tgg tta cag tat tta atc acc aga gtc gag gcg cac ttg	144
Leu Ile Trp Trp Leu Gln Tyr Leu Ile Thr Arg Val Glu Ala His Leu	
35 40 45	

caa gtg tgg atc ccc cct ctc aat gtt cgg gga ggc cgc gat gcc atc	192
Gln Val Trp Ile Pro Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile	
50 55 60	

atc ctc ctc acg tgc gca gtc cac cca gag cta atc ttt gac atc acc	240
Ile Leu Leu Thr Cys Ala Val His Pro Glu Leu Ile Phe Asp Ile Thr	
65 70 75 80	

aaa ctc ctg ctc gcc ata ttc ggt ccg ctc atg gtg ctc cag gca ggc	288
Lys Leu Leu Leu Ala Ile Phe Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly	
85 90 95	

ata acc aaa gtg ccg tac ttc gtg cgt gcg cag ggg ctc att cgt gcg	336
Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala	
100 105 110	

tgt atg ttg gtg ccg aag gct gcg ggg ggt cat tat gtc caa atg gcc	384
Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala	
115 120 125	

10

20

30

ttc atg aag cta gct gcg ctg aca ggt acg tac gtt tat gac cat ctc	432
Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu	
130 135 140	
act cca ttg cag gat tgg gcc cac gcg ggc cta cga gac ctt gca gtg	480
Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val	
145 150 155 160	
gcg gta gag ccc gtc atc ttc tct gac atg gag gtc aag atc atc acc	528
Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile Ile Thr	
165 170 175	
tgg ggg gcg gac acc gcg gca tgc ggg gac atc att tca ggt ctg ccc	576
Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro	
180 185 190	
gtc tcc gct cga agg gga agg gag ata ctc ctg gga ccg gcc gat aat	624
Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Asn	
195 200 205	
ttt gaa ggg cag ggg tgg cga ctc ctt gcg ccc atc acg gcc tac tcc	672
Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser	
210 215 220	
caa cag aca cgg ggc cta ctt ggt tgc atc atc acc agc ctc aca ggc	720
Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly	
225 230 235 240	
cgg gac aag aac cag gtc gag ggg gag gtt caa gtg gtc tcc acc gct	768
Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala	
245 250 255	
aca caa tct ttc ctg gcg acc tgc gtc aac ggc gtg tgt tgg act gtc	816
Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val	
260 265 270	
ttc cat ggc gcc ggc tca aag acc ttg gcc ggc ccc aaa ggc cca atc	864
Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile	
275 280 285	
acc cag atg tac act aat gtg gac cag gac ctc gtc ggc tgg cag gcg	912
Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala	
290 295 300	
ccc cct ggg gcg cgc tcc atg aca cca tgc acc tgc ggc agc tcg gac	960
Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp	
305 310 315 320	
ctc tat ttg gtc acg aga cat gcc gac gtc att ccg gtg cgc cgg cgg	1008
Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg	
325 330 335	
ggc gac agt agg ggg agc ctg ctc tcc ccc agg cct gtc tcc tac ttg	1056
Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu	
340 345 350	

10

20

30

```

aag ggc tct tgg ggt ggc cca ctg ctc tgc cct tgg ggg cac gct gtg 1104
Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Ala Val
      355                      360                      365

ggc atc ttc cgg gct gct gtg tgc acc cgg ggg gtt gca aaa gcg gtg 1152
Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val
      370                      375                      380

gac ttc ata cct gtt gag tct atg gaa act acc atg cgg act agt agc 1200
Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg Thr Ser Ser
      385                      390                      395                      400

gct tgg cgt cac ccg cag ttc ggt ggt taa 1230
Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly *
      405

```

10

```

<210> 2
<211> 409
<212> PRT
<213> HCV

```

```

<400> 2
Met Asp Arg Glu Met Ala Ala Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Ile Gly
1      5      10      15
Leu Ala Leu Leu Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys Val Leu Leu Ala Arg
      20      25      30
Leu Ile Trp Trp Leu Gln Tyr Leu Ile Thr Arg Val Glu Ala His Leu
      35      40      45
Gln Val Trp Ile Pro Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile
      50      55      60
Ile Leu Leu Thr Cys Ala Val His Pro Glu Leu Ile Phe Asp Ile Thr
      65      70      75      80
Lys Leu Leu Leu Ala Ile Phe Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly
      85      90      95
Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala
      100     105     110
Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala
      115     120     125
Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu
      130     135     140
Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val
      145     150     155     160
Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile Ile Thr
      165     170     175
Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro
      180     185     190
Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Asn
      195     200     205
Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser
      210     215     220
Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly
      225     230     235     240
Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala
      245     250     255
Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
      260     265     270

```

20

30

Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile
 275 280 285
 Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala
 290 295 300
 Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp
 305 310 315 320
 Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg
 325 330 335
 Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu
 340 345 350
 Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Ala Val
 355 360 365
 Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val
 370 375 380
 Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg Thr Ser Ser
 385 390 395 400
 Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
 405

10

<210> 3
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> HCV

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1005)

<400> 3
 atg aaa aag aaa aag ctc gag cat cac cat cac cat cac act agt gca 48
 Met Lys Lys Lys Lys Leu Glu His His His His His Thr Ser Ala
 1 5 10 15

 ggc ata acc aaa gtg cgc tac ttc gtg cgt gcg cag ggg ctc att cgt 96
 Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg
 20 25 30

 gcg tgt atg ttg gtg cgg aag gct gcg ggg ggt cat tat gtc caa atg 144
 Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met
 35 40 45

 gcc ttc atg aag cta gct gcg ctg aca ggt acg tac gtt tat gac cat 192
 Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His
 50 55 60

 ctc act cca ttg cag gat tgg gcc cac gcg ggc cta cga gac ctt gca 240
 Leu Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala
 65 70 75 80

 gtg gcg gta gag ccc gtc atc ttc tct gac atg gag gtc aag atc atc 288
 Val Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile Ile
 85 90 95

 acc tgg ggg gcg gac acc gcg gca tgc ggg gac atc att tca ggt ctg 336
 Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu
 100 105 110

20

30

ccc gtc tcc gct cga agg gga agg gag ata ctc ctg gga ccg gcc gat	384
Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Trp Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp	
115 120 125	
aat ttt gaa ggg cag ggg tgg cga ctc ctt gcg ccc atc acg gcc tac	432
Asn Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr	
130 135 140	
tcc caa cag aca cgg ggc cta ctt ggt tgc atc atc acc agc ctc aca	480
Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr	
145 150 155 160	
ggc cgg gac aag aac cag gtc gag ggg gag gtt caa gtg gtc tcc acc	528
Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr	
165 170 175	
gct aca caa tct ttc ctg gcg acc tgc gtc aac ggc gtg tgt tgg act	576
Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr	
180 185 190	
gtc ttc cat ggc gcc ggc tca aag acc ttg gcc ggc ccc aaa ggc cca	624
Val Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro	
195 200 205	
atc acc cag atg tac act aat gtg gac cag gac ctc gtc ggc tgg cag	672
Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln	
210 215 220	
gcg ccc cct ggg gcg cgc tcc atg aca cca tgc acc tgc ggc agc tcg	720
Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser	
225 230 235 240	
gac ctc tat ttg gtc acg aga cat gcc gac gtc att ccg gtg cgc cgg	768
Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg	
245 250 255	
cgg ggc gac agt agg ggg agc ctg ctc tcc ccc agg cct gtc tcc tac	816
Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr	
260 265 270	
ttg aag ggc tct tcg ggt ggc cca ctg ctc tgc cct tcg ggg cac gct	864
Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Ala	
275 280 285	
gtg ggc atc ttc cgg gct gct gtg tgc acc cgg ggg gtt gca aaa gcg	912
Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala	
290 295 300	
gtg gac ttc ata cct gtt gag tct atg gaa act acc atg cgg act agt	960
Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg Thr Ser	
305 310 315 320	
agc gct tgg cgt cac ccg cag ttc ggt ggt aaa aag aaa aag taa	1005
Ser Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly Lys Lys Lys Lys *	
325 330	
ggatcc	1011

10

20

30

<210> 4
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> HCV

<400> 4
 Met Lys Lys Lys Lys Leu Glu His His His His His His Thr Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg
 20 25 30
 Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met
 35 40 45
 Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His
 50 55 60
 Leu Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala
 65 70 75 80
 Val Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile Ile
 85 90 95
 Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu
 100 105 110
 Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp
 115 120 125
 Asn Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr
 130 135 140
 Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr
 145 150 155 160
 Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr
 165 170 175
 Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr
 180 185 190
 Val Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro
 195 200 205
 Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln
 210 215 220
 Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser
 225 230 235 240
 Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg
 245 250 255
 Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr
 260 265 270
 Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Ala
 275 280 285
 Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala
 290 295 300
 Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg Thr Ser
 305 310 315 320
 Ser Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly Lys Lys Lys Lys
 325 330

10

20

30

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> HCV

<400> 5
 ccatggaccg ggagatggct

20

<210> 6
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> HCV

<400> 6
 ggatccttaa ccaccgaact gcgggtgacg ccaagcgcta ctagtccgca tggtagtttc 60
 cat 63

<210> 7
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> HCV

<400> 7
 gctcgagcat caccatcacc atcacactag tgcaggcata accaaa 46

<210> 8
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> HCV

<400> 8
 aacaatggat ccttactttt tctttttacc accgaactgc ggggtg 45

<210> 9
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> HCV

<400> 9
 acctgccata tgaaaaagaa aaagctcgag catcaccatc accat 45

<210> 10
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> HCV

<400> 10
 Ala Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile
 1 5 10 15
 Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln
 20 25 30
 Met Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp
 35 40 45
 His Leu Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu
 50 55 60
 Ala Val Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly
 85 90 95
 Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala
 100 105 110
 Asp Asn Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala
 115 120 125
 Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu
 130 135 140

10

20

30

Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp
 165 170 175
 Thr Val Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly
 180 185 190
 Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp
 195 200 205
 Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser
 210 215 220
 Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg
 225 230 235 240
 Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser
 245 250 255
 Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His
 260 265 270
 Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys
 275 280 285
 Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg
 290 295 300

<210> 11
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> HCV

<400> 11
 Met Ala Ala Ser Cys Gly Gly Ala Val Phe Ile Gly Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys Val Leu Leu Ala Arg Leu Ile Trp Trp
 20 25 30
 Leu Gln Tyr Leu Ile Thr Arg Val Glu Ala His Leu Gln Val Trp Ile
 35 40 45
 Pro Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile Leu Leu Thr
 50 55 60
 Cys Ala Val His Pro Glu Leu Ile Phe Asp Ile Thr Lys Leu Leu Leu
 65 70 75 80
 Ala Ile Phe Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Ile Thr Lys Val
 85 90 95
 Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala Cys Met Leu Val
 100 105 110
 Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Phe Met Lys Leu
 115 120 125
 Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140
 Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile Ile Thr Trp Gly Ala Asp
 165 170 175
 Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg
 180 185 190
 Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Asn Phe Glu Gly Gln
 195 200 205
 Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg
 210 215 220
 Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn
 225 230 235 240

10

20

30

Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe
 245 250 255
 Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Phe His Gly Ala
 260 265 270
 Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr
 275 280 285
 Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala
 290 295 300
 Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val
 305 310 315 320
 Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg
 325 330 335
 Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser
 340 345 350
 Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg
 355 360 365
 Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro
 370 375 380
 Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg
 385 390

<210> 12
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> HCV

<400> 12

Ala Leu Leu Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys Val Leu Leu Ala Arg Leu
 1 5 10 15
 Ile Trp Trp Leu Gln Tyr Leu Ile Thr Arg Val Glu Ala His Leu Gln
 20 25 30
 Val Trp Ile Pro Pro Leu Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile
 35 40 45
 Leu Leu Thr Cys Ala Val His Pro Glu Leu Ile Phe Asp Ile Thr Lys
 50 55 60
 Leu Leu Leu Ala Ile Phe Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Ile
 65 70 75 80
 Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala Cys
 85 90 95
 Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Phe
 100 105 110
 Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr
 115 120 125
 Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala
 130 135 140
 Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile Ile Thr Trp
 145 150 155 160
 Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro Val
 165 170 175
 Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Asn Phe
 180 185 190
 Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln
 195 200 205
 Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg
 210 215 220
 Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr
 225 230 235 240

10

20

30

10

<400> 13

20

30

```

Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly
      260      265      270
Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val
      275      280      285
Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val
      290      295      300
Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly
305      310      315      320
His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala
      325      330      335
Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg
      340      345      350

```

```

<210> 14
<211> 341
<212> PRT
<213> HCV

```

10

```

<400> 14
Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile Leu Leu Thr Cys Ala Val His
 1      5      10      15
Pro Glu Leu Ile Phe Asp Ile Thr Lys Leu Leu Leu Ala Ile Phe Gly
      20      25      30
Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val
      35      40      45
Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala
      50      55      60
Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr
      65      70      75      80
Gly Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His
      85      90      95
Ala Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser
      100      105      110
Asp Met Glu Val Lys Ile Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys
      115      120      125
Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu
      130      135      140
Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Asn Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu
      145      150      155      160
Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
      165      170      175
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
      180      185      190
Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys
      195      200      205
Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr
      210      215      220
Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
      225      230      235      240
Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr
      245      250      255
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
      260      265      270
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
      275      280      285
Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
      290      295      300

```

20

30

Leu Cys Pro Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 305 310 315 320
 Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met
 325 330 335
 Glu Thr Thr Met Arg
 340

<210> 15
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> HCV

<400> 15
 Ala Gln Gly Leu Ile Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly His Tyr Val Gln Met Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly
 20 25 30
 Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala
 35 40 45
 Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp
 50 55 60
 Met Glu Val Lys Ile Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly
 65 70 75 80
 Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile
 85 90 95
 Leu Leu Gly Pro Ala Asp Asn Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu
 100 105 110
 Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys
 115 120 125
 Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu
 165 170 175
 Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln
 180 185 190
 Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro
 195 200 205
 Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp
 210 215 220
 Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu
 245 250 255
 Cys Pro Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr
 260 265 270
 Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu
 275 280 285
 Thr Thr Met Arg
 290

10

20

30

<210> 16
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> HCV

<400> 16
 Ala Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile
 1 5 10 15
 Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln
 20 25 30
 Met Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp
 35 40 45
 Ala Leu Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu
 50 55 60
 Ala Val Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly
 85 90 95
 Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala
 100 105 110
 Asp Asn Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala
 115 120 125
 Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu
 130 135 140
 Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp
 165 170 175
 Thr Val Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly
 180 185 190
 Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp
 195 200 205
 Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser
 210 215 220
 Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg
 225 230 235 240
 Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser
 245 250 255
 Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His
 260 265 270
 Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys
 275 280 285
 Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg
 290 295 300

10

20

<210> 17
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> HCV

<400> 17
 Ala Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile
 1 5 10 15
 Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln
 20 25 30
 Met Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp
 35 40 45

30

```

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

```

10

20

```

<210> 18
<211> 303
<212> PRT
<213> HCV

```

```

<400> 18
Ala Gly Ile Thr Lys Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile
 1          5          10          15
Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln
      20          25          30
Met Ala Phe Met Lys Leu Ala Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asp
      35          40          45
His Leu Thr Pro Leu Gln Asp Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu
      50          55          60
Ala Val Ala Val Glu Pro Val Ile Phe Ser Asp Met Glu Val Lys Ile
65          70          75          80
Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala Ala Gly Asp Ile Ile Ser Gly
      85          90          95
Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala
      100          105          110
Asp Asn Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala
      115          120          125
Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu
      130          135          140

```

30

Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Val Ser
 145 150 155 160
 Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp
 165 170 175
 Thr Val Phe His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly
 180 185 190
 Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp
 195 200 205
 Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser
 210 215 220
 Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg
 225 230 235 240
 Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser
 245 250 255
 Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His
 260 265 270
 Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys
 275 280 285
 Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg
 290 295 300

10

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> HCV
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Asp labeled with anthranilyl

20

<221> VARIANT
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa at position 6 is Abu
 <221> VARIANT
 <222> (6)...(7)
 <223> Abu-A between 6 and 7 is C(O)-O
 <221> VARIANT
 <222> (9)...(9)
 <223> Tyr at position 9 is derivatized with 3-NO₂

<400> 19
 Asp Asp Ile Val Pro Xaa Ala Met Tyr Thr Trp
 1 5 10

30

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> HCV

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Asp labeled with anthranilyl
 <221> VARIANT
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa at position 6 is Abu

<400> 20
 Asp Asp Ile Val Pro Xaa
 1 5

40

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> HCV

<400> 21
 Ser Phe Glu Gly Gln Gly Trp Arg Leu Leu
 1 5 10

【 図 2 】

FIGURE 1A

NS2/3(810-1206)STのヌクレオチド配列(配列番号1)

tgcagccggg agatgatgtc atcgtgogga ggcgcgggtt tcataggctc tgcactottg
 acctttccac cactactataa agtgcctctc cgtatggtca tatctgggtt agcatattta
 atctccagag tctgtgcgaa tctggaagtt tggatccccc cttatggctt tcggggaggc
 cgcgatgca tcatctctct caagtgcgca gtccacacac agctaactbt tgcatacac
 aaactctgtcgctacatttcggtcgctcattgctgtccaggcagcaaacaaagtgcgctac
 tctgtgctgt cgcaggggct cattcgtgcg tgtatgttgg tcgggaaggt cgggggggt
 catatgatct aaatggctct catgaaagca cgtcgtgtga caggtacgtta cgtttatgat
 catctcactc catctcagga tctgggcccac gccgggtccca gagaactcgt agtggcgta
 gcgcggctca tcttctctga catggaaggtc aagataatca cctggggggc ggacacccgc
 gaotcgggg agcatatttc aggtctgcc ctctccgctc taactgggag gaagatactc
 ctgggaacgc cogaataatt tgaaggaggg ggttgccgac tccggggac caacagccc
 ctactccaac agacaacggg cctactatgt tgcatactca cagcagctcac agggccggac
 agaacacagc tcggaggggg ggttccacag ctctccacgc ctacacaact tctctggc
 acctgcctca acggcgtgtg ttgactgtc ttccatggcg ccggtccaaa gacctbgcc
 ggcgccaaag gcccaatcac ccagatgtac actaatagtt accaggagct cgtcgtctgt
 caggcgcgcc cccggatcgc tctccatgca cctacgaact cggggagcgt gaacbtcat
 ttggtcagca cagacgcgca cgtcatctcg gtgcgcgcgc gggggcgagc taggggggac
 ctgtctctcc cggcgtctct ctctcaattc agtggctctt cgggtggccc actgctgtgc
 ccttcggggc acgtttgtgg catcttcggc gctgctgtgt gccacccgggg ggttgcaaaa
 ggggtggact ctactacgtc tgaactctag gaaactaca tcgggaatag tagcgttgg
 cgtcacccgc cgttcgggtg t

【 図 1 B 】

FIGURE 1B

NS2/3(810-1206)-STのアミノ酸配列(配列番号2)

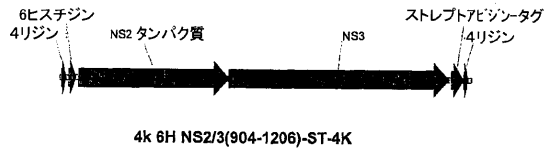
```

MREMASQSG  GAVTIGIALL  TLSPIYKVL  ARLZHWQLY  ITRVRLHLQV  WPIPLANVRG  RDAIILLT
WYHELPIFD  KILLAIIFGL  MLVQAQGL  PYVTRAQGL  RACMEVRKGA  GHGYVQAMRE  KLAALGTG
YDELPTLVA  AHAGRLDRA  ANBPVFSIM  EFKTIRADL  TACSDI1334  VLPQASRRGE  ILLAGDPT
GGWRLLPFI  TAYSQOTRG  LGGCITISL  RDKMVKVRP  QVSTATQSD  LATCVNGVSR  TVFHGAGS
LKGKGPATP  LYNFNOQDL  GWAPCPGAR  MTPCTCGSD  LYLTVTRHSD  IPRVRGKDSR  GSLLSPRPF
YLGSBGGLP  MFCNGHAGV  PRAVCTRGY  AKAVDFPIE  SNETMRTSS  AMRHPQFGG

```

【 図 3 】

FIGURE 3



【図 4】

FIGURE 4

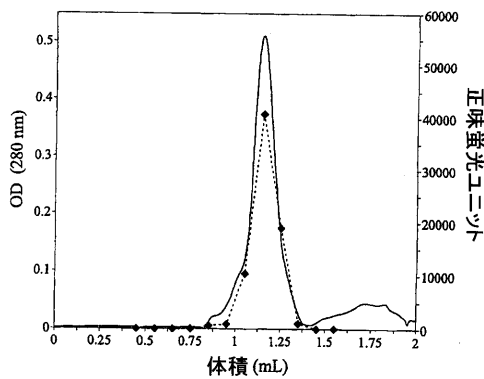
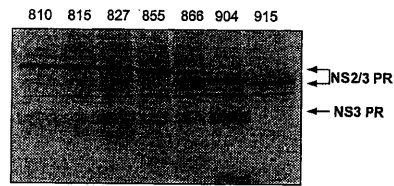
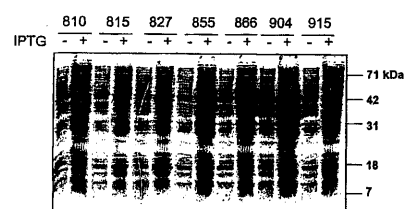


FIGURE 2

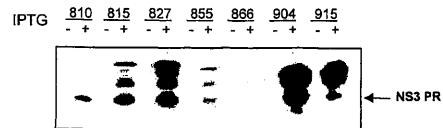
A. in vitroで翻訳されたN末端欠失変異体



B. E. coli 発現 - SDS-PAGE

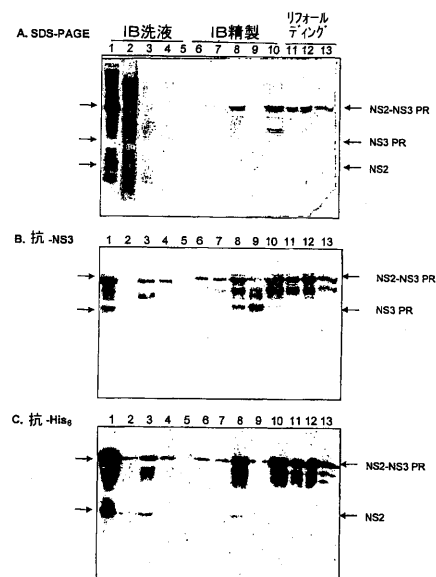


C. E. coli 発現 -抗NS3を用いた免疫ブロット



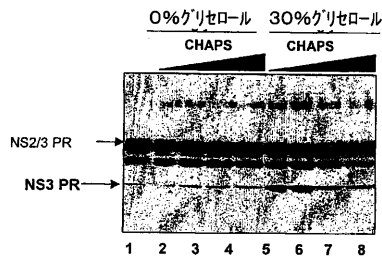
【図 5】

FIGURE 5



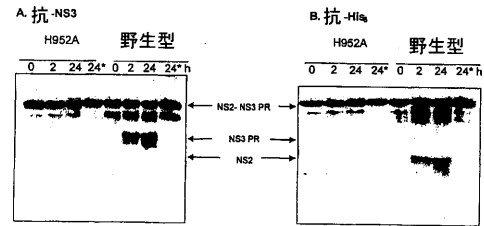
【図 6】

FIGURE 6



【図 8】

FIGURE 8



【図 9 A】

FIGURE 9A

4K-6H-NS2/3(904-1206)ST-4Kのヌクレオチド配列
(配列番号3)

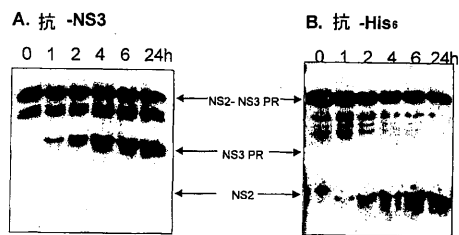
```

atgaaaaaga aaaagctcga goataccat caccatoca ctagtgcagg oataacaaa
gtgcogtact togtgcgtgc gcaggggote attogtgcgt gtatgttgtt ggggaaggct
goggggggtc attatgtcca aatgggottc atgaagtag ctgcogtgac aggtacgtac
gtttatgacc atctcactcc attgcaggat tgggcccacy cgggcctacg agacottgca
gtggggtag agccogtcat cttctctgac atggaggcca agatcatcac ctggggggcg
gaacacogcg catgcgggga catcatttca ggtctgcogc totcogctcg aaggggaaag
gagatactcc tgggacogcg cgataatttt gaagggcagg ggtgcogact cottgoyccc
atnagggoot actcccaaca gacacggggc ctaottgtgt gcatcatcac cagcctcaca
ggcogggaca agaaccaggt cgagggggag gttcaagtgt totcaccogc tacacaatct
ttcctggoga cctgcogtcaa cggcgtgtgt tggactgtct tccatggcgc cggctcaag
acottggcgc gcccacaagg cccaatcacc cagatgtaca ctaatgtgga caggacotc
gtoggcctgc agggcgcgcgc tggggcgcgc tccatgacac catgacotcg cggcagctcg
gacotctatt tggtcacgag acatgcogac gtcattcogc tgcgcogcg gggcagacgt
agggggagcc tgcctcctcc caggcctgtc tccactctga agggctcttc ggtgggcca
ctgctctgoc cttcggggca cgttgtgggc atcttcoggg ctgctgtgtg caccoggggg
gttgcaaaag cgggtggactt catacctgtt gactctatgg aaacatccat cgggactagt
agcgtttggc gtcacccgca gttoggtgtt aaaaagaana agtaaggatc c

```

【図 7】

FIGURE 7



【図 9 B】

FIGURE 9B

4K-6H-NS2/3(904-1206)ST-4Kのアミノ酸配列
(配列番号4)

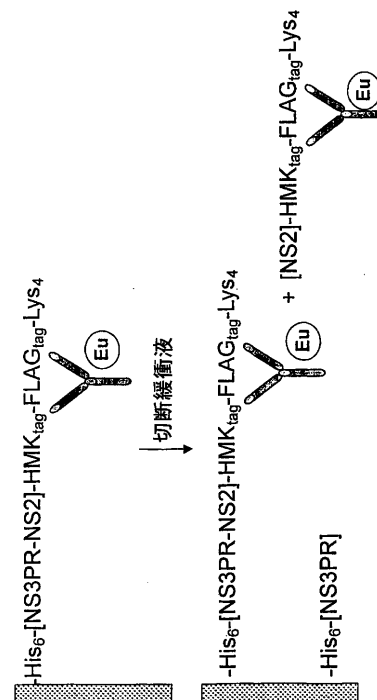
```

MKKKLEHHH HHHTSAGITK VPYFVRAQL IRACMLVREA AGGHYVQMAP MKLAALTGYT 60
VYCHLTPLAD WAHAGLRDLA VAVFVPSD MEVKIITWGA DTAACGDIIS GLPVSARRGR 120
EILLGPADNF EGQWRLLEAP ITAYSQTRG LIGCIITSLT GRDKNQVEGS VQVSTATQS 180
FLATCVNGVC WTVFHAGSK TLAGRKPIIT QMTNVDQDL VHWQAPPGAR SMTPTCGSS 240
DLVLTREHAD VIPVREERGDS RGSLLSPRPV SYLKGSSGPF LLCPSGHAVG IFRAAVCTRG 300
VAAVDFIFV ESMETMRTS SAMRHQPGG KKKK 337

```

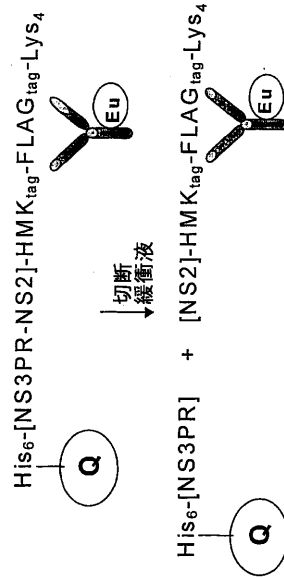
【図 10】

FIGURE 10



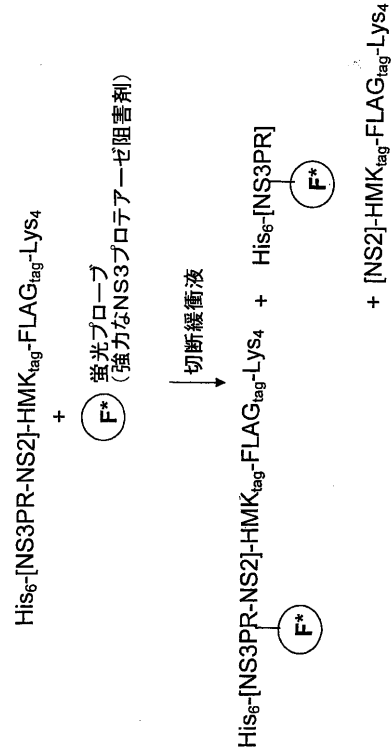
【図 1 1】

FIGURE 11



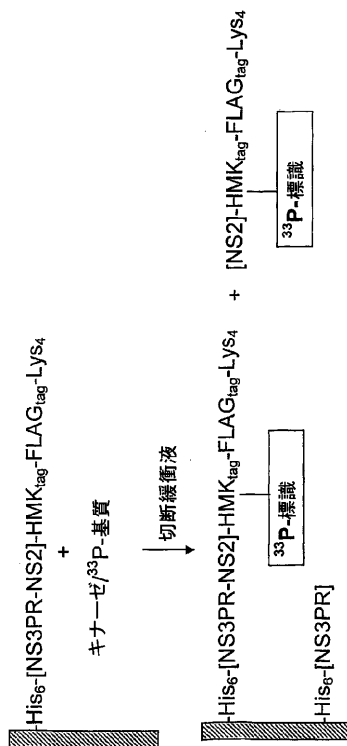
【図 1 2】

FIGURE 12



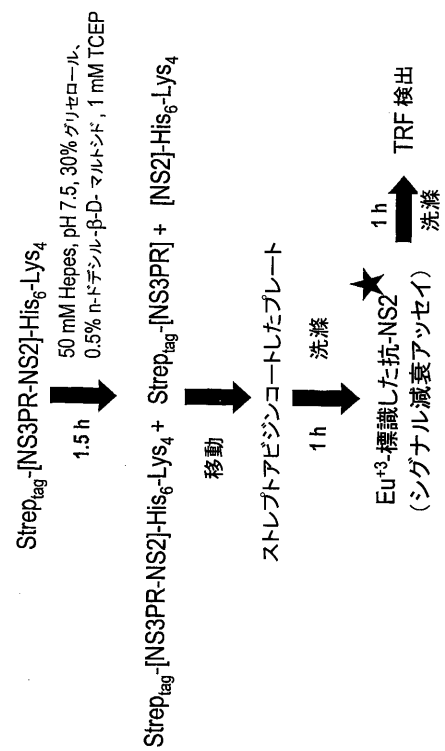
【図 1 3】

FIGURE 13



【図 1 4】

FIGURE 14



フロントページの続き

- (74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
- (74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
- (74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (72)発明者 シボールト ダイアン
カナダ ケベック エイチ7エス 2ジー5 ラヴァル キュナール ストリート 2100
- (72)発明者 ラマール ダニエル
カナダ ケベック エイチ7エス 2ジー5 ラヴァル キュナール ストリート 2100
- (72)発明者 モーリス ロジャー
カナダ ケベック エイチ7エス 2ジー5 ラヴァル キュナール ストリート 2100
- (72)発明者 ビロート ルイス
カナダ ケベック エイチ7エス 2ジー5 ラヴァル キュナール ストリート 2100
- (72)発明者 ポーズ アーナム
カナダ ケベック エイチ7エス 2ジー5 ラヴァル キュナール ストリート 2100

審査官 坦ケ 隆幸

- (56)参考文献 特表2003-526361 (JP, A)
Journal of Virology, 1995, vol.69, p.4127-4136
Journal of Virology, 1995, vol.69, p.7461-7471

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed
JSTPlus(JDream2)