

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3921552号

(P3921552)

(45) 発行日 平成19年5月30日(2007.5.30)

(24) 登録日 平成19年3月2日(2007.3.2)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

B

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

A 6 1 K 39/12

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

請求項の数 23 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願平10-520321
 (86) (22) 出願日 平成9年10月29日(1997.10.29)
 (65) 公表番号 特表2000-514314(P2000-514314A)
 (43) 公表日 平成12年10月31日(2000.10.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL1997/000593
 (87) 国際公開番号 W01998/018933
 (87) 国際公開日 平成10年5月7日(1998.5.7)
 審査請求日 平成11年11月15日(1999.11.15)
 (31) 優先権主張番号 96203024.3
 (32) 優先日 平成8年10月30日(1996.10.30)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者
 ベーリンガー インゲルハイム フェトメ
 ディカ ゲーエムペーハー
 ドイツ国 インゲルハイム アム ライン
 ビンゲル シュトラーセ 173
 (74) 代理人
 弁理士 西教 圭一郎
 (74) 代理人
 弁理士 杉山 毅至
 (74) 代理人
 弁理士 廣瀬 峰太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNAウイルス感染性クローンおよびそれから誘導されるワクチンと診断アッセイ法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

P R R S Vのゲノムに基づく感染性クローンの産生方法であって、

(i) 3'末端がアミノ保護基で修飾されているプライマーを用いてP R R S Vのゲノムの5'末端配列を構築する工程と、

(i i) 40~109個のA残基のポリA配列を有する3'末端配列を構築する工程と、

(i i i) (a) 少なくとも1個の全長DNAコピーであって、15098bのゲノムサイズと、前記DNAコピーの3'末端における40~109個のA残基のポリA配列とを有する、少なくとも1個の全長DNAコピーを含む組換え核酸、または

(b) 前記組換え核酸の誘導体であって、P R R S VのO R F 1 aにおける変異、P R R S VのO R F 7の下流にP a c I部位を有する変異、および/またはP R R S VのO R F 7の下流にS w a I部位を有する変異を含む誘導体を産生させる工程と、

(i v) (a) 前記組換え核酸または(b) 前記組換え核酸の誘導体をそのRNAコピーに転写する、in vitro転写工程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項2】

P R R S Vのゲノムに基づく感染性クローンの産生方法であって、

(i) 野生型P R R S Vに非感受性の宿主細胞を、(a) 少なくとも1個の全長DNAコピーであって、15098kbのゲノムサイズと前記DNAコピーの3'末端における40~109個のA残基のポリA配列とを有する、少なくとも1個の全長DNAコピーを含む組換え核酸の転写RNAコピー、または(b) 前記組換え核酸の誘導体であって、P R

10

20

R S V の O R F 1 aにおける変異、P R R S V の O R F 7の下流に P a c I 部位を有する変異、および / または P R R S V の O R F 7の下流に S w a I 部位を有する変異を含む誘導体の転写 R N A コピーでトランスフェクションし、
(i i) 感染性クローンを選択することを特徴とする方法。

【請求項 3】

宿主細胞が B H K - 2 1 細胞であることを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法により得られる感染性クローンからなる組換え核酸。

【請求項 5】

請求項 4 記載の組換え核酸からなることを特徴とする修飾 R N A ウイルス。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の修飾 R N A ウイルスで感染した細胞。

【請求項 7】

単離された P R R S V であって、O R F 1 a , 1 b または 2 ~ 7 のいずれかから選ばれる O R F に欠失を有する P R R S V ゲノムの c D N A コピーの in vitro 転写 R N A である組換え核酸を含み、P R R S V の全長ゲノムのサイズは 1 5 0 9 8 b であることを特徴とする単離された P R R S V。

【請求項 8】

組換え核酸を有する、または組換え核酸でトランスフェクションされた宿主細胞であって、少なくとも 1 個の全長 D N A コピーまたは R N A ウイルスのゲノムの in vitro 転写 R N A コピーを含み、該 R N A ウイルスのゲノムが、P R R S V であり、該 D N A または R N A コピーは、A T G A T G T G T A の配列を含む全長 P R R S V ゲノムを含むことを特徴とする宿主細胞。

【請求項 9】

単離された D N A 分子であって、P R R S V ゲノムに基づく感染性クローンを含み、該感染性クローンは、

R N A ウイルスの全長ゲノムの in vitro 転写 R N A コピーおよび R N A ウイルスの全長ゲノムに相補的な D N A から成る群から選ばれる核酸を含む組換え核酸を産生させることを含む工程によって産生され、前記 R N A コピーまたは相補的 D N A は、A T G A T G T G T A を含む全長 P R R S V ゲノムを含むことを特徴とする単離された D N A 分子。

【請求項 10】

P R R S V のゲノムに基づく遺伝子組換え R N A ウイルスであって、該遺伝子組換え R N A ウイルスのゲノムは A T G A T G T G T A を含み、該遺伝子組換え R N A ウイルスは、P R R S V の全長ゲノムの in vitro 転写 R N A コピー、包膜された感染性 R N A ウイルスを産生するために必要とされる遺伝情報を欠く P R R S V ゲノムの in vitro 転写 R N A コピー、P R R S V 全長ゲノムに相補的な D N A、および包膜された感染性 P R R S V を産生するために必要とされる遺伝情報を欠く P R R S V ゲノムに相補的な D N A から成る群から選ばれる核酸配列を含む組換え核酸で、前記遺伝子組換え R N A ウイルスを産生するために前記 P R R S V での感染に非感受性である宿主細胞をトランスフェクションすることを含む工程によって産生され、P R R S V の全長ゲノムのサイズは 1 5 0 9 8 b であることを特徴とする遺伝子組換え R N A ウイルス。

【請求項 11】

感染性クローンは、P R R S V に特定の病原性マーカーおよび / または血清マーカーをコード化する少なくとも 1 個の核酸配列をさらに含み、前記少なくとも 1 個の核酸配列は病原性変化および / または変化した血清学的免疫反応を生じるように修飾されることを特徴とする請求項 10 記載の遺伝子組換え R N A ウイルス。

【請求項 12】

前記病原性マーカー、もしくは前記血清マーカー、または前記病原性マーカーおよび前記血清マーカーをコード化する前記核酸配列は、構造ウイルス・タンパクをコード化するゲ

10

20

30

40

50

ノムの ORF 7 内に位置することを特徴とする請求項 11 記載の遺伝子組換え RNA ウィルス。

【請求項 13】

ORF 7 を含む核酸配列をさらに含み、前記 ORF 7 は PRRSV の ORF 7 のオーソログによって置換されることを特徴とする請求項 10 記載の遺伝子組換え RNA ウィルス。

【請求項 14】

少なくとも 1 個の付加的異種核酸配列が組換え核酸に挿入され、遺伝子組換え RNA ウィルスを前記少なくとも 1 個の異種核酸配列の送達システムとして機能させることを特徴とする請求項 10 記載の遺伝子組換え RNA ウィルス。

【請求項 15】

前記異種核酸配列が抗原をコード化していることを特徴とする請求項 14 記載の遺伝子組換え RNA ウィルス。

【請求項 16】

少なくとも 1 個の ORF を含む核酸配列をさらに含み、前記少なくとも 1 個の ORF は、遺伝子組換え RNA ウィルスが導入された動物における病原性変化および / または *in vitro* 血清学的反応変化を生じるように修飾されることを特徴とする請求項 10 記載の遺伝子組換え RNA ウィルス。

【請求項 17】

前記宿主細胞が前記 PRRSV の少なくとも 1 個の構造タンパクを発現することを特徴とする請求項 10 記載の遺伝子組換え RNA ウィルス。

【請求項 18】

請求項 10 記載の遺伝子組換え RNA ウィルスで感染した細胞培養物。

【請求項 19】

ORF 1a、1b または 2 ~ 7 のいずれかから選ばれる ORF に欠失を有する PRRSV ゲノム に相補的な DNA を含む核酸を含み、PRRSV 全長ゲノムのサイズが 15098 b であることを特徴とする DNA。

【請求項 20】

宿主細胞が RNA ウィルスの感染性クローンでトランスフェクションされて遺伝子組換え RNA ウィルスを産生するタイプの工程によって産生された遺伝子組換え RNA ウィルスであって、該工程において、RNA ウィルスとして PRRSV を使用し、前記遺伝子組換え RNA ウィルスを産生するために前記 RNA ウィルスでの感染に非感受性である宿主細胞を使用し、そこから遺伝子組換え RNA ウィルスを回収し、PRRSV の全長ゲノムのサイズは 15098 b であることを特徴とする遺伝子組換え RNA ウィルス。

【請求項 21】

プラス鎖 RNA ウィルスのゲノムに基づく感染性クローンを含む組換え核酸であって、該 RNA ウィルスが PRRSV であり、該 RNA ウィルスのゲノムが ATGATGTGTA を含み、前記感染性クローンは、

前記 RNA ウィルスの全長ゲノムの *in vitro* 転写 RNA コピー、少なくとも 1 個の包膜タンパクをコード化する遺伝情報を欠く前記 RNA ウィルスの *in vitro* 転写 RNA コピー、前記 RNA ウィルスの全長ゲノムに相補的な DNA および少なくとも 1 個の包膜タンパクをコード化する遺伝情報を欠く前記 RNA ウィルスゲノムに相補的な DNA から成る群から選ばれる核酸配列を含む組換え核酸を産生することを含む工程によって産生され、PRRSV の全長ゲノムのサイズが 15098 b であることを特徴とする組換え核酸。

【請求項 22】

動物におけるプラス鎖 RNA ウィルスのゲノムに対して免疫反応を高めるための組成物であって、該プラス鎖 RNA ウィルスは PRRSV であり、該プラス鎖 RNA ウィルスのゲノムは ATGATGTGTA を含み、該組成物は、

少なくとも 1 個の包膜タンパクをコード化する遺伝情報を欠く前記プラス鎖 RNA ウィルスゲノムの *in vitro* 転写 RNA コピー、

前記プラス鎖 RNA ウィルスの全長ゲノムに相補的な DNA、および

10

20

30

40

50

少なくとも1個の包膜タンパクをコード化する遺伝情報を欠く前記プラス鎖RNAウイルスゲノムに相補的なDNAから成る群から選ばれる組換え核酸配列を含み、PRRSVの全長ゲノムのサイズは15098bであることを特徴とする組成物。

【請求項23】

プラス鎖RNAウイルスのゲノムを含む細胞培養物であって、該プラス鎖RNAウイルスはPRRSVであり、該プラス鎖RNAウイルスのゲノムはATGATGTGTAを含み、該細胞培養物は、

少なくとも1個の包膜タンパクをコード化する遺伝情報を欠く前記プラス鎖RNAウイルスゲノムのin vitro転写RNAコピー、

前記プラス鎖RNAウイルスの全長ゲノムに相補的なDNA、および

10

少なくとも1個の包膜タンパクをコード化する遺伝情報を欠く前記プラス鎖RNAウイルスゲノムに相補的なDNAから成る群から選ばれる組換え核酸で、感染またはトランスフェクションされ、PRRSVの全長ゲノムのサイズは15098bであることを特徴とする細胞培養物。

【発明の詳細な説明】

本発明はRNAウイルスおよびRNAウイルスから得られる感染性クローンの領域に関する。さらに、本発明はかかるRNAウイルスの感染性クローンを用い、修飾することにより得られるワクチンと診断アッセイ法に関する。

組換えDNA技術は、DNAレベルでの核酸修飾を目的とした非常に多様で強力な生物学技法であり、分子レベルでゲノムを分析、修飾することを可能とする。この観点において、ウイルスはそのゲノムが小さなサイズであるが故に、特にそのような巧妙な取り扱いで分析することができる。しかし、組換えDNA技術は非レトロウイルス型のRNAウイルスに直接適用できる訳ではない。その理由はこれらのウイルスがその複製に際してDNA中間段階を含まないからである。かかるウイルスにとっては、組換えDNA技術をそのゲノムに適用して修飾ウイルスを生成させる前に、感染性クローン（例えば、DNAコピーとして、またはin vitroで転写したRNAコピーとして、またはそのいずれかの誘導体として）を開発する必要がある。感染性クローンはウイルスの全長（ゲノム長）cDNA（ここではRNAのDNAコピーにつき広い意味で用い、mRNAのDNAコピーについての厳密な意味ではない）の構築を経て誘導することができる。それについての研究では感染性転写物を全長cDNAでトランスフェクションした細胞中in vivoで合成するが、感染性転写物は完全なウイルスゲノムからなるin vitroで結合した部分長のcDNAフラグメントからin vitroで転写することによっても得ることができる。すべての場合において、転写されたRNAはcDNAに導入されたすべての修飾をもち、このように修飾したウイルスをさらに継代するのに使用することができる。

20

30

感染性cDNAクローンおよび感染性in vitro転写物は大量のプラス鎖RNAウイルス（総説としては、ボイヤーおよびヘンニー（Boyer and Haenni）、Virology 198、415～426参照）について12 kbまでのまたは僅かに大きいゲノムと共に産生されている。ペストウイルス（Pestivirus）のウイルスゲノム長はこれまで最も長いプラス鎖ウイルスRNAゲノムとされており、このものから感染性クローン（ムーアマン（Moormann）ら、J. Vir. 70：763～770）が調製されている。ゲノム長と関係する問題はバクテリアにおいて長い安定なcDNAクローンを得て維持することの困難さにあるのみならず、ウイルスの複製に関連する正常に関与するウイルス・タンパクの介助なしに宿主細胞中で複製が遂行される最初のRNA転写物の感染性にもある。感染を成功裏に達成するためには、ウイルス転写物がウイルス・コード化タンパクと、特にウイルス・レプリカーゼと、また、翻訳機構などの宿主細胞成分と相互に作用しなければならない。従って、ウイルス転写物の構造はピリオンRNAの構造にできる限り近似していなければならない。さらなる問題は、ゲノムの3'側から転写されるサブゲノム・メッセンジャーRNAのメカニズムを経て複製するこれらプラス鎖RNAウイルスについて、また、ゲノムの一部のみである数種の構造タンパクからなる、裸のキャプシドまたは中空殻粒子などの、複製に際し欠陥のある干渉性粒子を生成するこれらプラス鎖RNAウイルスについて見出すことがで

40

50

きる。不完全ウイルスRNAフラグメントの存在または、例えば、転写されるウイルスRNAと、または複写中間物のRNAと相互作用するかあるいはそれを妨害し、その構造を損なうマトリックスもしくはヌクレオキャプシド・タンパクの存在が全長RNA鎖の合成を阻止し、その結果、ゲノム長のRNAを含む感染性ウイルスの生成を阻止する。

ブタ生殖呼吸器症候群ウイルス (PRRSV、ゲノム長さ15.2 kb) ととも呼ばれるレーリスタット (Lelystad) ウイルス (LV) はアルテリウイルス科 (Arteriviridae) の一つであり、この科はまた、ウマの動脈炎ウイルス (EAV、ゲノム長さ12.7 kb)、乳酸脱水素酵素 - 上昇ウイルス (LDV、ゲノム長さ、少なくとも14.2 kb)、およびサル出血熱ウイルス (SHFV、ゲノム長さ、約15 kb) (ミューレンベルフ (Muelenberg) ら、1993a; プラゲマンおよびメーニッヒ (Plagemann and Moennig)、1993) を含む。

最近、国際ウイルス分類委員会はこの科をコロナウイルス科 (Coronaviridae) (ゲノム長さ、28 ~ 30 kb) およびトロウイルス科 (Toroviridae) (ゲノム長さ、26 ~ 28 kb) と共に新しい目、ニドウイルス目 (Nidovirales) に入れることを決定した。このニドウイルス目はエンベロープRNAウイルスを代表し、プラス鎖RNAゲノムを含み、複製に際し、サブゲノムRNAの3'ネストセットを合成する。コロナウイルスとアルテリウイルスのサブゲノムRNAはウイルスゲノムの5'末端から誘導されるリーダー配列を含む (スパーン (Spaan) ら、1988; プラゲマンおよびメーニッヒ (Plagemann and Moennig)、1993)。トロウイルスのサブゲノムRNAはリーダー配列を欠いている (スニーデルおよびホルジネック (Snijder and Horzinek)、1993)。RNA依存性RNAポリメラーゼをコード化するORF1aおよび1bはゲノムRNAから発現されるが、構造タンパクをコード化するニドウイルス目のゲノム3'末端のより小さいORFはサブゲノムmRNAから発現される。

PRRSV (レーリスタット (Lelystad) ウイルス) は1991年ウエンスボート (Wensvoort) ら (1991) により最初に単離されたが、今ではブタ生殖呼吸器症候群ウイルス (PRRS) として知られる新しい疾患の原因物質であることが判明した。この疾患の主徴候はブタの呼吸器障害とメスブタの流産である。1987年に米国で、1991年にヨーロッパで最初に観察されたように、主要な発生は減少しているが、このウイルスは今なお米国、ヨーロッパおよびアジアで家畜の群れに経済的損失をもたらしている。PRRSVは肺胞マクロファージ中で優先的に増殖する (ウエンスボート (Wensvoort) ら、1991)。2 ~ 3の細胞株、例えば、CL2621およびサル腎臓細胞株MA-104からクローン化される他の細胞株 (ベンフィールド (Benfield) ら、1992; コリンズ (Collins) ら、1992; キム (Kim) ら、1993) もまた当該ウイルスに感受性である。いくつかの周知のPRRSV株は以下の受け入れ番号で知られている。CNCM I-1102、I-1140、I-1387、I-1388、ECACC V93070108、またはATCC VR2332、VR2385、VR2386、VR2429、VR2474、およびVR2402。PRRSVのゲノムは完全にまたは部分的に配列決定されており (コンゼルマン (Conzelmann) ら、1993; ミューレンベルフ (Muelenberg) ら、1993a; マーソウ (Murthaugh) ら、1995)、コード化しているが、その他にも、RNA依存性RNAポリメラーゼ (ORF1aおよび1b)、6種の構造タンパクがあり、その4種の包膜糖タンパクはGP₂ (ORF2)、GP₃ (ORF3)、GP₄ (ORF4) およびGP₅ (ORF5) であり、他は非グリコシル化膜タンパクM (ORF6) およびヌクレオキャプシドタンパクN (ORF7) である (ミューレンベルフ (Muelenberg) ら、1995、1996; バン・ニューシュタット (van Nieuwstadt) ら、1996)。PRRSVのEPおよびUS株の免疫学的特性化とヌクレオチド配列決定により、構造ウイルスタンパク中に位置するPRRSVの株内でのマイナーな抗原性の差異を確認している (ネルソン (Nelson) ら、1993; ウエンスボート (Wensvoort) ら、1992; マーソウ (Murthaugh) ら、1995)。

ブタは口鼻経路でPRRSVを感染させることができる。肺に入ったウイルスは肺胞のマクロファージにより取り込まれ、これらの細胞内でPRRSVの複製が9時間以内に完結する。PRRSVは12時間以内に肺から肺リンパ節に移行し、次いで、末梢のリンパ節

10

20

30

40

50

、骨髄および脾臓に3日以内に移動する。これらの部位では、ほんの2～3の細胞がウイルス抗原に陽性に着色する。このウイルスは少なくとも21日間、時にはより長く血中に存在する。7日後、PRRSVに対する抗体が血中に見出される。PRRS感染ブタ中にウイルスと抗体が組み合わさって存在することは、ウイルス感染が低レベルであっても、また抗体が存在するにもかかわらず、長時間生存し得ることを示している。少なくとも7週間、肺の肺胞細胞の個体群は正常SPFの肺と異なっている。

PRRSVは口鼻経路を介してブタに感染させるためにその包膜を必要とし、従って、ブタの正常な免疫応答はとりわけ1以上の包膜タンパクに対しての中和抗体産生を必然的に伴う。かかる抗体はウイルスを非感染性とする。しかし、ウイルスも肺胞マクロファージ中で一旦は裸のキャプシドを産生する。該キャプシドはMおよび/またはNタンパクにより包膜されたRNAで構築され、場合により部分的にある種の糖タンパクを含んでいる。これら不完全なウイルス粒子または(部分的に)裸のキャプシドが細胞内または細胞外に存在することは電子顕微鏡に証明することができる。ある場合には、核酸内容物をもたない裸のキャプシドが見つかることもある。裸のキャプシドは血流に乗り全身に拡散し、脾臓、リンパ節および骨髄でマクロファージにより血中から取り込まれる。これらの裸ではあるが感染力のあるウイルスキャプシドは、ブタが産生した抗体により中和されることがなく、従って、抗体の存在下でもウイルス感染の存続することが説明される。感染した骨髄細胞からのマクロファージの子孫はこの様式で身体の新たな部位へウイルス感染を拡大していく。すべての骨髄マクロファージ系統細胞が感染している訳ではないので、末梢部位の限られた少数のマクロファージのみが感染され、ウイルスを産生する。ORF7タンパクのみからなるPRRSVキャプシドは、例えば、マクロファージをキメラ仮性狂犬病(pseudorabies)ORF7ベクター・ウイルスで感染することにより他のウイルスタンパク不存在下で形成させることができる。PRVウイルスはPRRSVのORF7遺伝情報を含むように巧みに操作された。感染18時間後、感染細胞の細胞質はPRRSウイルス・ヌクレオキャプシドのサイズをもつ大量の小さな空の球形構造物を含んでいる。

本発明は感染性クローンをここに提供するが、該クローンはこれまでも感染性クローンを得ているプラス鎖RNAウイルスの、その最大ゲノムの長さをはるかに超えるゲノム長を有するウイルスから誘導する。本出願の実験の部では15.2 kbのゲノム長を有するPRRSVに基づき、それから誘導される感染性クローンの産生につき記載するが、かかるクローンは今や約15 kbのゲノム長を有するLDVおよびSHFVから、また、そのゲノムの僅かに小さいEAVから、また、コロナウイルス科またはトロウイルス科などの、より大きいゲノム長を有するウイルスから得ることができる。

本発明はまた感染性クローンを産生する方法を提供する。該方法は、不完全ウイルスRNAフラグメントの存在、あるいは例えば、転写されるRNA転写物と、または複写中間物のRNAと相互作用するかあるいはそれを妨害し、その構造を損なうマトリックスもしくはヌクレオ・キャプシド・タンパクの存在と関連して、ウイルスRNA鎖合成に際して遭遇する問題を回避することにより感染性クローンを産生する。該方法は全長RNA鎖合成を不要とし、従って、感染性ウイルスの産生を不要とする。本発明は宿主細胞をトランスフェクションすることにより感染性クローンを産生する方法を提供する。該方法は、野生型ウイルスでの感染には本質的に非感受性である宿主細胞を当該ウイルスに基づく組換え核酸でトランスフェクションし、次いで、該ウイルスに感受性の細胞に移行させるか、該細胞と共培養することにより当該宿主細胞から感受性子孫ウイルスを回収することからなる。本質的に感受性ではない細胞とは、当該研究ウイルスの複製に常時用いる細胞と比較して、当該研究ウイルスにほんの僅かに感受性であるか、全く感受性ではないものであるが、他のウイルス株には完全に感受性であってもよい。本発明は野生型ウイルスでの感染に非感受性の宿主細胞をトランスフェクションすることにより感染性クローンを産生する方法を提供する。この場合には、RNAフラグメントと、ウイルスRNA鎖合成に干渉するマトリックスまたはヌクレオチドキャプシドタンパクとからなる裸のキャプシドまたは不完全ウイルス粒子の産生を避けることからなる。感染性ウイルスはこのようにトランスフェクションした宿主細胞から、該ウイルスに感受性の細胞に移行することにより回収す

10

20

30

40

50

る。実験の部で、どのようにこの方法でP R R S Vの感染性クローンを得るかを記載するが、この方法はまた、他のプラス鎖RNAウイルスにも適用することができる。

本発明はまた、組換えDNA技術のさらなる応用により修飾した感受性クローンを産生させる可能性を提供する。かかる修飾は単回または複数回の変異、置換、欠失もしくは挿入またはその組み合わせであり、技術上既知の組換えDNA技法により達成することができる。このように、本発明は修飾したRNAウイルスを提供し、該ウイルスはRNAウイルスの研究およびワクチン調製に使用することができる。

本発明はまた、例えば、P R R S Vなどのアルテリウイルス科 (Arteriviridae) からの感染性クローンを提供するものであり、該感染性クローンは該クローンが基本となるウイルスを原因とする疾患に対し単回用途ワクチンとして使用することができる。例えば、P R R S Vに基づく感染性クローンは今やP R R S Vの発病マーカーまたは血清学的マーカーを研究するのに用いることができる。P R R S Vの既知血清学的マーカーは、例えば、O R F 2 ないし 7 によりコード化したP R R S Vの構造タンパクのいずれかに位置しているが、O R F 1a および 1b によりコード化したタンパクにも見出すことができる。発病マーカーはP R R S Vの非構造タンパクをコード化するO R F 1a および 1b に存在するが、O R F 2 ないし 7 によりコード化した構造タンパクのいずれにも見出すことができる。これらのマーカーに関して感染性クローンのゲノムを修飾することにより、その親株に比べて悪性ではないか、または弱いP R R S V、および/またはワクチン投与したブタと野生型ウイルスで感染したブタとの間の血清学的分化を可能とするために血清学的マーカーを欠失させる、あるいは導入することにより修飾したP R R S Vを得ることが可能である。かかる修飾は、例えば、P R R S V 感染性クローンにより提供されるが、そこでは、O R F 7 N タンパクをコード化する核酸配列がATCC VR2332またはLDVのO R F 7 タンパクと置き換わっている。

本発明はまた、例えば、P R R S Vなどのアルテリウイルス科 (Arteriviridae) から誘導される感染性クローンをも提供し、このものは多様な抗原の送達システムまたはウイルス・ベクター・ワクチンとして用いることができる。かかるクローンにおいては、研究対象ウイルスの配列に対応しない異種核酸配列が挿入される。かかる異種核酸配列は、例えば、選び抜いた抗原をコード化する配列から誘導することができる。この抗原は病原に対し免疫性を誘導するタンパクまたはペプチドである。該ウイルスは骨髄のマクロファージおよびマクロファージ系統細胞に感染し、その孫細胞を介して抗原含有ウイルスを分布するので、このウイルス・ベクターワクチンは免疫系に中心的な細胞に感染し、さらに進んだ工程で抗原を呈示することができる。該ベクターワクチンウイルスは樹枝状マクロファージまたはカッパー (Kuppfer) 細胞または他の免疫系細胞などの抗原呈示細胞に感染し、(不完全)エンベロープ・ウイルス粒子として、あるいは裸のキャプシド粒子としてこれを実施することができる。裸のキャプシドまたは不完全ウイルス粒子での感染は持続する感染を確実にするので、免疫学的増幅効果は抗原を選択した病原に対し寿命の長い免疫性をもたらすだろう(低レベルでの刺激が継続する故に)。我々は他の病原性生物または物質のエピトープに情報を組み込むことにより、抗原キャリアーとして該ウイルスを使用することができる。外来エピトープ情報を担持するかかるベクターワクチンウイルスのいくつかは、一度に混合し、投与してもよい。この方法は1つの病原の数種の異なる抗原に対しての活発な免疫、あるいは数種の異なる病原に対しての活発な免疫を可能とする。

本発明はまた、例えば、P R R S Vなどのアルテリウイルス科 (Arteriviridae) から誘導される感染性クローンをも提供し、該クローンは二重目的のワクチンとして使用することができる。例えば、P R R S Vに基づく感染性クローンはP R R S Vともう一種の病原に対し防御するワクチンを構築するために使用することができるが、その場合、ベクターワクチンの開発を、P R R S V に対し向けられた単一目的のワクチンの開発を目指す開発と単に組み合わせることにより実施する。特定の二重目的ワクチンはブタの呼吸器疾患を防御する目的で開発されているが、そこではブタに感染することの知られた種々の他の呼吸器病原のいずれかから誘導した抗原をP R R S V ワクチンに挿入している。

本発明はまたワクチンを提供するが、それは単一目的の、二重目的の、あるいはベクター

10

20

30

40

50

のワクチンであり、当該ワクチンが環境に流出し得ないという意味で安全である。当該ワクチンの安全性（非流出性）は包膜した感染性ウイルスを生産するのに必要なこれらウイルスタンパクの情報に欠失させることによって確実なものとする事ができる。このウイルスは当該タンパクを構成的に発現する細胞株中で増殖しなければならない。この相補性細胞株でのウイルス複製は完全な包膜を有し、ブタのマクロファージに感染することができる。1回の複製サイクルの後、包膜タンパクの情報を欠く孫ウイルスは、最早、エンベロープウイルスのように他の細胞に感染することができない。体内でのマクロファージ感染は裸のキャプシドまたは不完全ウイルス粒子としてもなお可能である。

本発明はまた、ウイルス抗原およびタンパクをも提供するが、これらは本発明により修飾したRNAウイルスで感染させた細胞培養物から取得することができる。かかる抗原は、E L I S Aまたは当業者既知の他のタイプの診断アッセイなど、診断アッセイ法に使用することができる。かかるアッセイ法は一次診断のための単独型試験として、または本発明により修飾したRNAウイルスに基づき、識別ワクチンもしくはマーカーワクチンを接種した動物群に適用する随伴試験として使用することができる。

実験の部

in vitroで感染性RNAを転写し得るcDNAクローンの生産はプラス鎖RNAウイルスの分子遺伝子分析用の本質的な手段となっている。この技術はプラス鎖RNAウイルスに適用可能であり、そのRNAゲノムはmRNAとして機能し、適切な宿主細胞に導入したとき、完全な感染サイクルを始動する。多くのウイルスについて感染性クローンが記載されており、遺伝子の発現、複製、ウイルスタンパクの機能およびRNAウイルスの組換えに関する研究を容易なものとしている（総説についてはボイヤーおよびヘンニー（Boyer and Haenni）1994年参照）。さらに、これらのクローンは新しいウイルスベクターおよびワクチンの開発のために考慮することができる。感染性cDNAクローンについてはアルテリウイルスに関しこれまで記載されたことはない。我々はPRRSVの感染性クローン産生およびキメラPRRSVウイルス産生におけるその最初の応用につきここに報告する。

材料と方法

細胞およびウイルス

PRRSV（またはLV）のター・ハーン（Ter Huurne）株（CNCMに寄託、パリ、受け入れ番号I-1102）は1991年に単離し（ウエンスボート（Wensvoort）ら、1991）、一次肺胞マクロファージ中またはCL2621細胞中で増殖した。ター・ハーン（TH）株の6次継代物をこの研究に使用した。また、この株の誘導体、LV4.2.1をCL2621細胞上に適合させ、系列継代により増殖した。肺胞マクロファージはRPMI 1640増殖培地（フロー）に維持し、一方、CL2621細胞はハンクス（Hanks）の最小必須栄養培地（ギブコーBRL/ライフ・デクノロジー）に維持した。BHK-21細胞はダルベッコ（Dulbecco）の最小必須栄養培地に維持した。トランスフェクションの実験のために、BHK-21細胞はグラスゴー（Glasgow）最小必須栄養培地（ギブコーBRL/ライフ・デクノロジー）中に、リルジェストロームおよびガロフ

(Liljeström and Garoff)

（1993年）の方法に従い増殖させた。

ウイルスRNAの単離

すでに記載されているように（ミューレンベルフ（Muelenberg）ら、1993a）、感染多重度1でPRRSVにより感染、24時間後の肺胞マクロファージまたはCL2621細胞から細胞内RNAを単離した。ビリオン・ゲノムRNAを単離するために、ビリオンをバン・ニューシュタット（van Nieuwstadt）ら（1996）の記載どおりに、スクロース勾配により精製し、TNE（0.01Mトリス-HCl、pH7.2、0.1M NaCl、1mMEDTA）に再懸濁した。プロティナーゼKバッファー（100mMトリス-HCl、pH7.2、25mMEDTA、300mM NaCl、2%（w/v）SDS）1mlおよびプロティナーゼK（ペーリンガー・マンハイム）0.4mgを精製PRRSVビリオン（ 10^8 TCID₅₀）1mlに加えた。この反応混合物を37℃で30分間培養

した。RNAをフェノール/クロロホルム(1:1)で1度抽出し、エタノールで沈殿した。該RNAをエタノール中-20℃で保存した。このRNA沈殿物の1/10を逆転写(RT)反応に用いた。

PRRSVゲノムの5'および3'末端クローニング

PRRSVのウイルス・ゲノム5'末端を改良一本鎖連結反応により一本鎖cDNAとする手法によりクローニングした(SLIC、エドワード(Edwards)ら、1991)。上記のように調製したビリオンRNAの1/10をプライマー11U113(5'TACAGGTGCTGTATCCAAGA3')とのRT反応に用いたが、該プライマーはゲノムのヌクレオチド1232~1251に相補的である。該RT反応は既に記載のように(ミュレンベルフ(Muelenberg)ら、1993b)最終容量20μlで実施した。次いで、6M NaOH 2μlをRT反応物に加え、RNAを37℃で30分間水解した。一本鎖cDNAをベリンガー・マンハイムの高純度PCR産物精製キットを用いて精製した。精製したcDNAをエタノールで沈殿し、TEに再懸濁し、連結反応して固定プライマーALG3(5'CA CGAATTCATCTATCGATTCTGGATCCTTC3')とした。このプライマーはEcoRI、ClaIおよびBamHI部位を含み、その3'末端は自己結合を防ぐためにアミノ保護基で修飾されている。一本鎖cDNA産物を、50mMトリス-HCl(pH8.0)、10mM MgCl₂、10μg/ml BSA、25%PEG、1.0mMヘキサミン塩化コバルト、40μM ATP、および0.5μl(10U)T4 RNAリガーゼ(ニューイングランド・バイオラボ)中、4pmol ALG3に結合した。結合反応物の1/3をPCRの鋳型として用い、プライマーとしてLV69(5'AGGTCGTCGACGGGCCCGTGATCGGGTACC3')およびALG4(5'GAAGGATCCAGAATCGATAG3')を用いた。プライマーLV69はヌクレオチド594~615に相補的であり、ALG4は固定プライマーALG3に相補的である。PCRの条件はミュレンベルフ(Muelenberg)ら(1993b)の記載どおりであり、得られた産物はEcoRIおよびSalIで消化し、pGEM-4Zにクローニングした。同様の方策を用いてLVゲノムの5'末端を細胞内LV RNAからクローニングした。これらの実験のために、LVを感染させたCL2621細胞から単離した総細胞RNA10μgを使用した。5'cDNAクローンの配列を決定し、公開されたPRRSV配列ミュレンベルフ(Muelenberg)ら、1993a)に比べて10個分のヌクレオチドが伸長した1クローンpABV387をさらなる実験に使用した。

長鎖ポリ(A)尾部を含む3'末端cDNAクローンはプライマーLV76(5'TCTAGGAATTCTAGACGATCG(T)₄₀3')でLV RNAを逆転写することにより構築されたが、該LV76はEcoRI、XbaIおよびPvuI部位を含んでいる。逆転写反応に続き、プライマーLV75(5'TCATAGGAATTCTAGACGATCGT3')、および39U70R(5'GGAGTGGTTAACCTCGTCAA3')によりPCRを実施した。なお、LV75はポリ(T)延伸部を除きLV76と同一であり、39U70Rはセンスプライマーであって、LVゲノムのヌクレオチド14566~14585に相当し、HpaI部位を含んでいる。得られるPCR産物をHpaIおよびEcoRIで消化し、同じ酵素で限定したcDNAクローンpABV39にクローニングした(図1)。45A(pABV382)と109A(pABV392)のポリ(A)伸長部および正しいゲノムcDNA配列を含む2つのcDNAクローンは、オリゴヌクレオチド配列決定により評価されるごとく、全長ゲノムcDNAクローンを構築するのに使用した。

配列分析

オリゴヌクレオチドの配列はアプライド・バイオシステムズのPRISMTM迅速反応ダイ・デオキシTMターミネーター・サイクル配列決定キットおよび自動シーケンサーにより決定した。

PRRSVの全長ゲノムcDNAクローンの構築

LVのゲノム・ヌクレオチド配列を決定するために以前に生成したcDNAクローン(ミュレンベルフ(Muelenberg)ら、1993a)を図1に示した常套の制限部位で共に結合した。プラスミドpABV254をpABVクローン25、11、12および100から構築し、前の研究に用いた(デン・ブーン(denBoon)ら、1996)。標準クローニ

10

20

30

40

50

ング手法はサムブルーク (Sambrook) ら (1989) の方法に従い実施した。これにより高コピー数のプラスミド pGEM-4Z を LV の cDNA に重なり合って含む3種のプラスミドを得た。プラスミド pABV331 および pABV369 は LV ゲノムのヌクレオチド 5 ~ 6015 からなる。ヌクレオチドの相違はその領域で配列決定した6種の独立した cDNA クローンの一組中に 1 : 1 の割合で 3462 位に見出された。このヌクレオチドの相違は ORF1A の 1084 位のアミノ酸置換に至った (Pro に代わって Leu)。我々はこのアミノ酸が感染性に及ぼす影響について予測し得なかったため、Leu コード化 cDNA フラグメントを EcoRV (ヌクレオチド 3403) および SacII (ヌクレオチド 3605) 部位で交換することにより pABV331 にクローニングし、その結果、pABV369 とした。プラスミド pABV384 は LV ゲノムのヌクレオチド 5168 ~ 9825 からなる。プラスミド pABV20 および pABV5 と重なり合う適切な cDNA クローンが未だ入手できず、また、最終的に pABV331 および pABV369 の cDNA 配列に融合し得ないので、2種類の新しい cDNA フラグメントを RT-PCR により産生した。ヌクレオチド 5169 ~ 5186 に相当するセンス・プライマー LV59 (5' TCGG AATCTAGATCTCACGTGGTGCAGCTGCTG 3') およびヌクレオチド 6078 ~ 6097 に相補的なアンチセンス・プライマー 61U303 (5' CATCAACACCTGTGCAGACC 3') を1回の PCR に使用した。センス・プライマー 61U526R (5' TTCCTTCTCTGGCGCATGAT 3') はヌクレオチド 5936 ~ 5955 に位置し、LV60 (5' GTACTGGTACCGGATCCGTGAG GATGTTGC 3') はヌクレオチド 6727 ~ 6745 に相補的でもあり、もう一つの PCR に使用した。これら2つの PCR フラグメントは LV59 に包含された Xba I 部位を用い、pABV20 の内部 Apo I 部位 (ヌクレオチド 6006) および LV60 にも包含させたヌクレオチド 6740 の BamHI 部位に共に結合させた。新たな cDNA フラグメントを完全に配列決定したが、公開された配列と異なるアミノ酸となるような変異は含んでいなかった (ミュールンベルグ (Muelenberg) ら、1993a)。プラスミド pABV368 は PRRSV のヌクレオチド 8274 ~ 13720 を含んでいる。pGEM-4Z の cDNA フラグメントをさらに結合させると不安定なクローンとなるので、pABV331 / 369、pABV384 および pABV368 の挿入物を pOK12 の 5' および 3' cDNA フラグメントに結合させた (ピエラおよびメッシング (Viera and Messing) ら、1991)。プラスミド・ベクター pOK12 は pGEM-4Z よりコピー数が少ないので、大型の外来 cDNA 配列のクローニングにより適していると期待される。プラスミドを大腸菌株 DH5a に形質転換し、カナマイシン 15 µg/ml の存在下 32 で増殖させ、コピー数をできるだけ低くした。まず、pABV382 ((A)₄₅) と pABV392 ((A)₁₀₉) の cDNA フラグメントを EcoRI で消化、この部位をクレノウ (Klenow) ポリメラーゼ (ファルマシア) で平滑断端に改変し、次いで、BamHI で消化、切除した。これらのフラグメントを BamHI および Fsp I で消化した pOK12 にクローン化し、後者の部位は平滑断端に改変し、pABV394 および pABV395 とした。この方法で pOK12 に存在する T7 RNA ポリメラーゼ・プロモーターを除去した。次いで、pABV368 と pABV384 の cDNA フラグメントを、フランキングまたはベクター配列中の Bcl I 部位 (ヌクレオチド 13394)、Sca I 部位 (ヌクレオチド 8657) および BamHI と Bgl II 部位を用いて 3' 末端 cDNA クローンに結合させた。このようにしてプラスミド pABV401 および pABV402 とした (図1)。

LV ゲノムの 5' 末端に直接融合した T7 RNA ポリメラーゼ・プロモーターを含む 5' cDNA クローンはプライマー LV83 (5' GAATTCAGTGAATACGACTCACTATAGATGATGTG TAGGGTATTCC 3') および LV69 を用い pABV387 から PCR により増幅した。LV83 は 5' 側から 3' への順で EcoRI と Spe I 部、T7 RNA ポリメラーゼ・プロモーター配列、転写開始用の単一の G、および LV ゲノムのヌクレオチド 1 ~ 19 から構成される。PCR フラグメントを pOK12 の EcoRI と Sal I 部位にクローニングし、pABV396 とした。pABV396 の正しい配列をオリゴヌクレオチド配列決定法により評価した。次いで、pABV331 および pABV369 の LV cDNA フラグメントを Apa I および BamHI で切除し、pABV396 に結合し、Apa I および BamHI で消化した。最終的

に、得られる 5' cDNA フラグメントを、T7 RNA ポリメラーゼ・プロモーターの上流 Spe I 部位とウイルスゲノムの 5168 位のユニーク Pml I 部位を用い、pABV401 および pABV402 にクローニングした。この方法により、親株に類似のウイルスに対応するものとして、また、外来読み取り枠を含むキメラウイルスに対応するものとして、ゲノム長 cDNA クローンを得た。

PacI および/または SmaI 部位を含む変異ウイルスの産生

ORF7 遺伝子の直ぐ下流のゲノム長 cDNA クローンにユニーク Pac I 部位を導入するために、ヌクレオチド 14987 および 14988 の T および A 両方を、センスプライマー LV108 (5' GGAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAAAACCAGAGCC 3') とアンチセンスプライマー LV112 (5' CCATTCACCTGACTGTTTAATTAACCTTGACCCCTGA 3') および

10

センスプライマー LV111 (5' TCAGGGTGCAAGTTAATTAACAGTCAGGTGAATGG 3') と LV75 を用いる PCR により A と置換えた。同様に、ユニーク Sma I 部位は、プライマー LV108 と LV110 (5' CCTGA CTGTCAA TTTAAATTGCACCCTGAC 3') およびプライマー LV109 (5' GTCAGGGTGCAATTTAAATTGAC AGTCAGG 3') と LV111 を用いる PCR により 14980 位の G を T に、14985 位の T を A に代えることにより創製した。PCR フラグメントを、創製した Pac I と Sma I 部位およびフランキング Hpa I と Xba I 部位を用いて pABV395 に結合し、それぞれ pABV427 および pABV426 とした。このフラグメントは、次いで、同じユニーク Hpa I と Xba I 部位を用いて pABV414 に挿入し、pABV437 および pABV442 とした (図 4 参照)。pABV437 および pABV442 の転写物から回収したウ

20

イルスのマーカー変異を検出するために、感染ブタ肺胞マクロファージの上清から RNA を単離した。この RNA を逆転写 PCR に用い、プライマー LV76、LV75 および 39U70R によりフラグメントを約 0.6 kb (入手可能な長さのヌクレオチド 14576 ~

ポリ A 尾部に及ぶ) に増幅した。PCR フラグメントを Pac I または Sma I で消化することにより遺伝子マーカーの存在を検出した。RNA の in vitro 転写およびトランスフェクション LV の全長ゲノム cDNA フラグメントを含むプラスミド pABV414、pABV416 を Pvu I で線形化したが、このものはポリ (A) 伸長部の直ぐ下流に位置している。セムリキ森林熱ウイルス (SFV) 発現ベクター pSFV1 (ミューレンベルフ (Muelenberg) ら、1997) の ORF4 からなるプラスミド pABV296 を SpeI で線形化し、in

30

vitro の転写およびトランスフェクション実験用対照として用いた。線形化したプラスミドをエタノールで沈殿し、そのプラスミドの 1.5 µg を、リルジェストロームおよびガロフ

(Liljeström and Garoff) (1991 年と 1993 年) による SFV についての記載方法に従い、T7 RNA ポリメラーゼ (プラスミド pABV414、pABV416) または Sp6 RNA ポリメラーゼ (pABV296) による in vitro 転写に使用した。in vitro 転写した RNA をイソプロパノールで沈殿させ、70% エタノールで洗浄し、用時まで -20 で保存した。BHK-21 細胞を M6 ウェルに接種し (約 10⁶ 細胞/ウェル)、リルジェストロームおよびガロフ

40

(Liljeström and Garoff)

(1993 年) 記載の最適条件に従い、リポフェクチン 10 µl と混合した RNA 2.5 µg でトランスフェクションした。別法として、RNA をエレクトロポレーションにより BHK-21 細胞に導入した。この場合、10 µg の in vitro 転写した RNA または細胞内 LV RNA をリルジェストロームおよびガロフ

(Liljeström and Garoff)

(16) のエレクトロポレーション条件を用い、約 10⁷ BHK-21 細胞にトランスフェクションした。培地をトランスフェクション 24 時間後に採取し、CL2621 細胞に転移させ、感染性ウイルスを回収した。トランスフェクションし感染させた細胞は、実質的にウエンズポート (Wensvoort) ら (1986) 記載のように、免疫ペルオキシダーゼ

50

単層アッセイ (IPMA) によりLV-特異タンパクの発現について試験した。GP₃、GP₄、MおよびNタンパクに対するモノクローナル抗体 (MAbs) 122.13、122.59、122.9および122.17 (バン・ニューシュタット (van Nieuwstadt) ら、1996) をIPMAの染色に用いた。

結果

LVゲノムRNAの5'末端配列の再構築

切断型5'末端を有するin vitro転写RNAの感染性は報告されているが (デイビス (Davis) ら、1989; クランプ (Klump) ら、1990)、感染性クローンを得るためには最末端の5'端と3'端を含む全ウイルス配列が必要であることが一般に認められている。LVゲノムの5'末端をクローニングするためには、一本鎖cDNAに一本鎖を結合する改善した手法 (SLIC; エドワード (Edwards) ら、1991) が用いられた。LVで感染したCL2621細胞から単離した細胞内RNAおよび精製したビリオンからのLV RNAの両方を、ORF1Aの5'末端に相補的なプライマーLV96を用いた逆転写した。第一鎖cDNA産物を、3'末端の自己結合を防止した固定プライマーALG3に結合した。結合した産物をPCRにより増幅し、クローニングした。LV細胞内RNAから誘導し、二通りの独立したPCRから得られる12種のクローン、およびビリオンRNAから誘導し、二通りの独立したPCRから得られる14種のクローンを配列決定した。これら26種のcDNAクローンからの22クローンは当該cDNA配列に比べ、10のヌクレオチド (5' ATGATGTGTA 3') の伸長部分を含んでいた (既に公開、ミュールンベルフ (Muelenberg) ら、1993a)。一方、4種のクローンはこの付加配列の5'末端に1~3個のヌクレオチドを欠いていた (表1)。このことから我々が結論したことは、これらの10種のヌクレオチドがLVゲノムの最末端5'端を表し、従って、ゲノム長cDNAクローンに包含されているということであった。

LVゲノム長cDNAクローンの構築

LVのゲノム長cDNAクローンを構築するために、図1に図示した方策に従って、既に単離、配列決定されているcDNA (ミュールンベルフ (Muelenberg) ら、1993a) を共有した制限酵素部位で結合させた。さらに、新しいcDNAフラグメントをゲノム長cDNAクローンに組み上げるために産生した。ヌクレオチド5168~6740にわたる1種のcDNAフラグメントをRT-PCRにより創製し、クローンpABV5およびpABV20からのcDNA配列の連結反応を可能とした。in vitro転写用のT7 RNAポリメラーゼ・プロモーターをPCRによりLVゲノムの5'末端に直接結合し、pABV396にクローニングしたこの新しいcDNAフラグメントをゲノム長cDNAクローンに挿入した。6種の新たな独立したcDNAクローンにつきヌクレオチド3420~3725を再度配列決定した結果、ORF1aのアミノ酸1084にLeuおよびProが1:1の割合で存在していることを示していた。我々は最終的ゲノム長cDNAクローンから転写されるRNAの感染性に対してこのアミノ酸の影響を予測し得なかったため、このクローンを構築するために両方を使用した。3'末端では、2種の異なるcDNAクローンを使用した。我々は以前に最大20個のAのポリ (A) 尾部を含む3'末端cDNAクローンを得ていた (ミュールンベルフ (Muelenberg) ら、1993a)。しかし、LDVなど関連ウイルスのポリ (A) 尾部の長さについて報告された研究 (チェン (Chen) ら、1994) の観点で、全ポリ (A) 尾部はより長いことが期待された。それ故、新たな3'末端cDNAクローンを40個のT残基伸長部を有するプライマーLV76を用い、産生させた。これらcDNAクローンの配列を決定すると、40~109個のA残基の伸長部を包含していた。最長のポリ (A) 伸長部 (109A残基、pABV392) を含むcDNAクローンをゲノム長cDNAクローン用に用いた。長鎖ホモ・ポリマー系は大腸菌中プラスミドの複製に干渉する可能性があるため (デンおよびウー (Deng and Wu)、1981)、我々はまた、次工程のクローニングにおいて使用するよう、45個のA残基を含む第二クローン、pABV382を選択した。既に観察されたことであるが、ゲノム長cDNAクローンを高コピー数のプラスミド中に保持すると、変異または欠失の蓄積が起こり、これらのクローンから合成された転写物の感染性喪失に至る (レイ (Lai) ら、1

10

20

30

40

50

991;ライス(Rice)ら、1987;スミヨシ(Sumiyoshi)ら、1992)。また、我々はpABVクローン331/369、384、および368のより大きなcDNAフラグメントをpGEM-4Zの5'および3'末端に結合させようとしたとき、プラスミドが不安定となることを観察した。それ故、我々は最終的にこれらのクローンを低コピー数のベクターpOK12中互いに融合させた(ビエラおよびメッシング(Viera and Messing)ら、1991)。その結果、ゲノム長cDNAクローンpABV414/415および416となるが、このものは使用した増殖条件下で大腸菌中安定的に繁殖することが可能であった。45または109個のA残基を含むゲノム長cDNAクローンの安定性に差異は認めなかった。

L V RNAの感染性

L Vはブタ肺胞マクロファージ中で優先的に増殖する。これまで、細胞株CL2621またはサル腎臓細胞株MA104から誘導された他のクローンはL Vを繁殖させることが示されている細胞株である(ベンフィールド(Benfield)ら、1992;コリンズ(Collins)ら、1992;キム(Kim)ら、1993)。それ故、CL2621細胞はL V RNAのトランスフェクションの最適条件を決めるために用いられた。L Vで感染したCL2621細胞から単離したRNAは、リポフェクチン、リポフェクタミン、DEAE-デキストランおよびエレクトロポレーションなどの異なる方法を用いて、異なる用量でCL2621にトランスフェクションした。トランスフェクション後7日までの細胞変性効果およびプラークにつき細胞をスクリーニングしたが、感染性ウイルスのこれらの徴候は検出できなかった。さらに、L V-特異抗原もL V-特異MAbsを使用するIPMAでは検出できなかった。pABV296からin vitroで転写したRNAはこれらの実験の対照として用いた。プラスミドpABV296は発現ベクターpSFV1に挿入したGP₄コード化ORF4遺伝子からなる(ミュレンベルフ(Muelenberg)ら、1997)。pABV296 RNAのトランスフェクション効率は、GP₄-特異MAbsでのIPMAによりトランスフェクションした細胞の染色により試験した。0.01%陽性CL2621細胞に至る最高のトランスフェクション効率がエレクトロポレーションで得られたが、一方、BHK-21細胞では同様の条件を用いて80~90%の陽性細胞を得た。これらの結果が示しているのは、CL2621細胞がトランスフェクション実験に適さず、一方、BHK-21細胞(野生型ウイルスでの感染に感受性でない)は驚くべきことに非常に適しているように思えることであった。従って、BHK-21細胞をL V RNAの感染性試験に用いた。L Vで感染したCL2621細胞から単離したRNA 2 μgを、SFVについて記載した条件(リルジェストロームおよびガロフ

(Liljeström and Garoff)、

1993)に従い、約10⁶ BHK-21細胞にリポフェクチンでトランスフェクションした。トランスフェクションの24時間後、細胞をL VのNタンパクに対するL V-特異MAb 122.17で染色した。約3~10個の個々の細胞が陽性に染色されたが、感染中心もしくはプラークが細胞から細胞に拡散している様子は観察されなかった。pABV296から転写した対照RNAのトランスフェクションではこれらの条件を用いて、BHK-21細胞の60~70%が陽性となった。細胞内L V RNAとpABV296 RNAでトランスフェクションしたBHK-21細胞の上清をCL2621細胞に移した。3~4日後、細胞内L V RNAでトランスフェクションしたBHK-21細胞からの上清と共に培養した細胞内にプラークを観察したが、pABV296 RNAでトランスフェクションしたBHK-21細胞からの上清で培養したものには観察しなかった。当該プラークはIPMAにおいてL V-特異MAbsで陽性に染色された。同様の結果は精製したL Vバリオンから単離したRNAを用いたときに得られた。さらに、陽性に染色された細胞数は細胞をエレクトロポレーションによりトランスフェクションしたときの2~4倍に増大した。これらのデータが示すのは、L VはBHK-21細胞に感染し得ないということであり、その最も可能性のある理由はそれらがL Vのレセプターを欠いているからということである。しかし、ゲノムRNAが一旦BHK-21細胞に導入された場合には、新たな感染性ウイルス粒子が産生され始め、培地中に分泌される。既にトランスフェクションされ

10

20

30

40

50

たBHK-21細胞をこれらの粒子、すなわち裸のキャプシドであるか、完全にもしくは部分的に包膜された粒子で再感染しようとしても感染は再び可能でなくなる。

感染性RNAのin vitro合成

野生型PRRSVに本質的に感受性でないBHK-21細胞は細胞内LV RNAからウイルスを回収するのに特に適切であり、感受性であるCL2621細胞は適切でないので、ゲノム長cDNAクローンから転写したRNAが感染性であるか否かの試験にはBHK-21細胞を用いた。プラスミドpABV414/416をPvuIで線形化し、T7 RNAポリメラーゼを用いin vitroで転写した。PvuI部位はポリ(A)伸長部の直ぐ下流に位置し、転写したRNAは3'末端に2つの非ウイルス性ヌクレオチドを含むようなものである。さらに、転写物は5'末端に非ウイルス性Gを含むべきであって、それがT7 RNAポリメラーゼの転写開始部位となる。in vitroで転写したRNA約2.5 µgをBHK-21細胞にトランスフェクションしたが、その際、CL2621細胞における引き続いてのウイルス回収用陽性対照として細胞内LV RNA 2 µgを、およびBHK-21細胞にRNAトランスフェクションするための陽性対照として、また、CL2621細胞における引き続いてのウイルス回収用陰性対照としてpABV296 RNAを共に用いた。トランスフェクション後24時間目に、細胞上清を採取し、細胞を固定、IPMA中N-特異MAb122.17で染色した。細胞内LV RNAでトランスフェクションしたBHK-21細胞を入れたウェル中ではほんの僅かの陽性細胞を観察しただけであるが、pABV414/416から転写したRNAでトランスフェクションしたBHK-21細胞のウェルでは800~2700の陽性細胞を観察した。感染性ウイルスが細胞から遊離したか否かをチェックするために、その上清をCL2621細胞の感染に用いた。プラークは、細胞内LV RNAおよびpABV414/415の転写物でトランスフェクションしたBHK-21細胞からの上清で感染したCL2621培養物に産生していた。該プラークはN、M、GP₄、およびGP₃タンパクに対するMAbsでIPMA中陽性に染色したが、このことはこれらのタンパクがすべて適切に発現されたことを示唆している。pABV296から転写したRNAでトランスフェクションしたBHK-21細胞の上清と共に培養したCL2621培養物には、IPMA中プラークも染色も認めなかった。従って、これらの結果が明白に示していることは、ゲノム長cDNAクローンpABV414およびpABV416からBHK-21細胞に転写したRNAをトランスフェクションすると、感染性LVの産生と遊離に至るということである。さらに、pABV414およびpABV416の転写物をリポフェクチンの代りにエレクトロポレーションによりBHK-21細胞にトランスフェクションした場合には、LV-特異MAbsに染色陽性の細胞が2~4倍に増大して得られた。これらエレクトロポレーションによるBHK-21細胞上清中の組換えウイルス力価は約 10^5 TCID₅₀/mlであった。

感染性コピーウイルスをター・ハーンおよびLV4.2.1に比較した増殖曲線

回収ウイルスの増殖特性

当初のトランスフェクションおよび感染実験は、vABV414およびvABV416と命名した回収組換えウイルスが同等に首尾よくブタ肺胞マクロファージに感染し増殖するが、細胞内LV RNAでトランスフェクションしたBHK-21細胞から回収したウイルスよりもCL2621細胞上でより緩慢に増殖することを示唆した。この細胞内LV RNAは、CL2621上での増殖に適合するLV4.2.1で感染したCL2621細胞から単離された。vABV414およびvABV416の増殖性をより徹底的に研究するために、増殖曲線をCL2621細胞およびブタ肺胞マクロファージ中で決定し、ブタ肺胞マクロファージ(TH)に移動しただけの野生型LVの曲線ならびにCL2621細胞上での増殖したLV4.2.1の曲線と比較した。2つの組換えウイルスの増殖速度は異なっておらず、それらがBHK-21から直接誘導したか、あるいはさらにブタの肺胞マクロファージに移動したかに関係なく同等に好適に増殖した(図3)。ブタの肺胞マクロファージ中の力価(7.1~7.9 TCID₅₀/ml)は感染後32時間頃にピークとなるが、一方、CL2621の力価はこの場合よりも遅く、感染後96時間目でもなおピークに達しなかった。THウイルスは組換え体と類似の増殖特性を保持していた。逆に、CL2621-適合

10

20

30

40

50

ウイルスLV4.2.1はウイルスv A B V 4 1 4、v A B V 4 1 6およびT HよりもC L 2 6 2 1細胞上でより急速に増殖した(図3)。要約すると、これらの結果が示しているのは、組換えウイルスの増殖性はT Hウイルスの増殖性に似ているということである。このことは予期された。というのは、感染性クローンを構築するのに用いたc D N A配列は、親の「非適合性」T Hウイルスから誘導したからである。

L V感染性クローンにおける遺伝子マーカー導入

ゲノム長c N D Aクローンが変異L Vウイルスを産生させるのに用い得ることを証明するために、ユニークPacIとSwaI部位をO R F 7遺伝子の直ぐ下流に、P C R指向変異誘発により導入した(図4)。Pac I部位を含むゲノム長c D N Aクローンp A B V 4 3 7およびSwa I部位を含むp A B V 4 4 2から転写したR N AをB H K - 2 1細胞にトランスフ
10
ェクションし、トランスフェクション後24時間目にその上清をブタ肺胞マクロファージおよびC L 2 6 2 1細胞に転移したときに、感染性ウイルスが産生された。回収したウイルスv A B V 4 3 7およびv A B V 4 4 2はブタの肺胞マクロファージおよびC L 2 6 2 1細胞において親ウイルスv A B V 4 1 4と類似の増殖性を示した(データ未開示)。約0.6 kbの特異領域(ヌクレオチド14576~ポリ(A)尾部)を逆転写およびv A B V 4 1 4とv A B V 4 1 6で感染させたブタの肺胞マクロファージ上清から単離したウイルスR N AのP C Rにより増幅した。Pac Iで消化すると、この制限部位はv A B V 4 3 7から誘導したフラグメントには実際に存在するが、v A B V 4 1 4から誘導したフラグメントには存在しないことを示した。同様に、v A B V 4 4 2にSwa I部位の存在する
20
ことが証明された(データ未開示)。このように我々は野生型ウイルスの混在可能性を排除することができた。従って、我々はv A B V 4 3 7とv A B V 4 4 2の本質を確認した。

考察

現代の組換えD N A技術は我々が分子レベルでゲノムを分析、改変し、その体制と発現につきより深く洞察することを可能にした。R N Aウイルスの場合には、そのためにゲノム長のc D N Aクローンの生成とそこから感染性転写物を合成し得ることが必要である。殆どの場合、感染性クローン構築のための必要条件はそれぞれのウイルスゲノムの末端配列を同定することであり、それが恐らくウイルスR N Aの複製にとって重要である。以前の研究では、L Vは3'末端にポリ(A)尾部が含まれていることを示した(ミューレンベルフ(Muelenberg)ら、1993a)。本研究では、L Vゲノムの確かな5'末端が決定
30
された。ウイルスゲノムR N Aまたはm R N Aの5'末端を決定する方法はいくつも発表されているが、その殆どには重大な制限がある。フラビウイルスおよびベスチウイルスに対して用いられる一つの方法はゲノムR N Aの環状化に基づいている。しかし、この方法ではゲノムの5'末端と3'末端の間の境界を明確にするために分析することが必要である。c D N Aの5'末端を迅速に増幅する方法(5'R A C E)は、末端デオキシリボヌクレオチド転移酵素(T d T)により、第一鎖c D N A鎖にホモポリマー尾部を付加することに基づいている。しかし、尾部形成反応はむしろ非効率であり、また、この反応は付加的な分析を必要とする。何故なら尾部の最初のヌクレオチドがウイルスの配列を表しているのか、あるいは既に酵素的に付加した尾部の部分なのか結論し得ないからである。この研究で我々はウイルスゲノムの最末端5'端を、特定配列を有するオリゴヌクレオチドを第一鎖プライマー伸長産物に結合し、P C Rにより増幅することにより決定した。公開
40
された配列に関し10個のヌクレオチド(ATGATGTGTA)の伸長が数種の独立したクローンに見出され、従って、それがウイルスゲノムの最末端5'端を表していると考えられた。要約すると、これは221個のヌクレオチドのリーダー配列となるが、これはE A V(207ヌクレオチド;デン・ブーン(den Boon)ら、1991)、S H F V(208ヌクレオチド;ゼン(Zeng)ら、1995)のリーダーの長さに似ているが、L D V(155ヌクレオチド;チェン(Chen)ら、1994)のリーダーより長い。しかし、これらアルテリウイルスのリーダー配列間に有意な相同性は存在しない。

最末端5'端をゲノム長c D N Aに包含させ、感染性クローンを創製した。感染性クローンを産生させる際の主な問題は、バクテリアでクローニングする際のウイルス配列の安定性ならびに正確な5'および3'末端生成の問題である。ゲノム長c D N Aクローンをp
50

GEM-4Zに組込む最初の試みは失敗したが、LVの15,207ヌクレオチド長のゲノムcDNAフラグメントは低コピー数プラスミドpOK12において安定であり、これまでに生成させたプラスRNA鎖ウイルスでは今や最も長い感染性クローンである。ゲノム長cDNAクローンの転写物は5'末端に5'キャップ構造と余分の非ウイルス性Gおよび3'末端に非ウイルス性CGを含むが、これらの拡張はその感染性を損なうものではなかった。幾人もの研究者が全長cDNAクローンから転写したRNAが、5'もしくは3'末端のいずれかで外来性非標準配列のために、あるいは不完全なキャッピングのために減弱した初期感染について報告している。キャップ構造を欠くLV全長cDNAの転写物は感染性ではなかった。感染性cDNAクローン転写物の感染性は常にウイルス感受性の細胞株で試験したが、ゲノム長cDNAクローンからの転写物あるいはCL2621細胞から単離したLV RNAの感染性は、これらRNAをCL2621細胞にトランスフェクションすることによって証明することはできなかった。これはCL2621細胞のトランスフェクション効率が乏しいことによるものであったが、それは恐らくウイルスRNA鎖合成が、ウイルスゲノムのフラグメントのみを含む裸のキャプシドなど、欠陥のある干渉性粒子でCL2621細胞が再感染されることから生じる不完全RNAフラグメントまたはキャプシドタンパクの干渉あるいは相互作用により妨げられるからである。しかし、全長cDNAクローンからの転写物または細胞LV RNAをBHK-21にトランスフェクションすると感染性ウイルスの産生と遊離に至り、このウイルスはCL2621細胞中に回収することができた。BHK-21細胞を裸のキャプシドで再感染しても感染は起こらず、従って、全長ウイルスRNAの合成も妨げることはない。特異的感染性ではin vitro転写RNA 1 µg当たり凡そ400~1500個が陽性細胞であったが、LV細胞内RNAでは1 µg当たり2~5個の陽性細胞が得られた。しかし、これらの特異的感染性は、LV-感染CL2621細胞から単離した細胞内RNAの非常に小さいフラクションのみがゲノムLV RNAを代表するものであるが故に比較することができない。さらに、ビリオンから単離したゲノムRNAをトランスフェクションに使用したが、その量は正確な定量を可能とするにはあまりに少なかった。

さらに、BHK-21細胞はLV-特異MAbsでのIPMAにより抗原産生につき点数を付けたが、それは必ずしも感染性ウイルスの産生と相関するものではない。このことは以下の事実から明らかである。すなわち、細胞内LV RNA 2 µgでトランスフェクションしたBHK-21細胞の上清は、CL2621細胞によりアッセイしたとき、全長cDNAクローンの転写物2.5 µgでトランスフェクションしたBHK-21細胞の上清よりも高い力価のプラーク形成単位を有していた。ポリ(A)尾部の長さがウイルス転写物の感染性に影響することが多くのウイルスについて既に示されているが(ホリーおよびアバウヘイダー(Holy and Abouhaidar)、1993; サロウ(Sarow)、1989)、45または109の残基をもつゲノムcDNAクローンからの転写物間の感染性において、我々は何らの差異も見出さなかった。その可能性としては、45A残基の尾部は長さの閾値を超えていて、対応する転写物の安定性がそれよりも低い値で変化しているのだろうということである。我々はORF1aのアミノ酸1084にクローンの差異を見出したが、そこではPROとLEUが1:1の比を与えた。このアミノ酸は感染性に影響しなかった。その理由はこのLEUまたはPROコドンをもつ全長cDNAクローンの転写物がBHK-21細胞の感染性に何らの差異も示さなかったからである。

ゲノム長感染性クローンはPRRSV株ATCC VR2332のヌクレオキャプシド・タンパクを発現するキメラウイルスの産生に使用した。さらに、ゲノム長感染性クローンはマウス・ウイルスLDVのヌクレオキャプシド・タンパクを発現するキメラウイルスの産生に使用した。キメラウイルスは株-特異MAbsにより親ウイルスと区別し得るが、PRRSVのター・ハーン(Tur Huurne)株のN(ORF7)タンパクと特異的に反応するモノクローナル抗体では着色しない。さらに、PRRSVのNタンパクがLDVのNタンパクと置換しているキメラウイルスは、PRRSVのNタンパクと反応するブタ回復期抗体とは反応しない。PRRSV感染ブタはすべてPRRSVのNタンパクに対する抗体を発現させるので、該キメラウイルスはPRRSVに対する新しい生ワクチンを使用する将来

のプロジェクトに使用されるだろう。また、このウイルスは特異的にその宿主細胞、肺胞マクロファージを標的とするベクター系として使用するプロジェクトにも使用されるだろう。この点では、死滅させたウイルスあるいは組換えサブユニットで防御しようとした初期の試みが無念に終わったことに言及しておく必要がある。これまでに入手し得る唯一の有効なPRRSワクチンはUS株に基づき改良した生ワクチンである（ゴルシカ（Gorcyc a）ら、1995）。しかし、この改良生産物を接種したブタは野生のウイルスを感染させたブタと識別することができない。PRRSVの感染性クローンはこのようにゲノムの部位指向変異誘発により、いわゆるマーカーワクチンを提供するが、その結果、予防接種したブタは野生ウイルス感染ブタと、血清抗体の差に基づき識別することができる。

本明細書に記載するLVの感染性クローンは、プラス鎖RNAウイルスについてかつて開発された最も長い感染性クローンであり、アルテリウイルス科の最初のものである。このPRRSVの感染性クローンを産生することは、このウイルスの病因論、宿主向性、および複製と転写を目指した研究に対し新たな機会を開くものである。アルテリウイルスおよびコロナウイルスは、リーダー・プライマー転写とも言う特異転写メカニズムを共有し、共通の5'リーダーを含むサブゲノムRNAのいわゆるネスト・セット（nested set）の産生に関与する（Spaan（Spaan）ら、1988；ブラゲマンおよびメーニヒ（Plagemann and Moennig）、1991）。このリーダー・プライマー転写は複雑な工程であり、未だに完全には理解されていない。リーダー・プライマー転写の基本的なメカニズムを解明するコロナウイルスのウイルス学者の研究は、欠陥のある障害となるRNAのcDNAの分析と部位指向の変異誘発に限定されるが、その理由はゲノムの大きなサイズ（28～30 kb）が感染性クローンの構築を妨げるからである。PRRSVの感染性クローンはアルテリウイルスとコロナウイルスの転写と複製の興味あるメカニズムを研究、解明するためのモデル系として有用である。

PRRSVから誘導される感染性クローンは、PRRSVゲノムに挿入された外来性抗原のための送達システムまたはベクターワクチンウイルスとしても使用することができる。その理由は、該ウイルスが骨髄中のマクロファージおよびマクロファージ系列細胞に感染し、その孫細胞を介して抗原含有ウイルスに分布するからである。アルテリウイルスまたはPRRSVのORF7もしくはNタンパクのフラグメントを含む抗原の特別な例では、これらの抗原が感染細胞の細胞膜外側に（過剰）発現し、それによって免疫応答をさらに高める。そのような免疫ブースター効果は病原に対する終生の免疫をもたらす（低レベルで刺激し続ける故に）。我々は当該ウイルスを抗原キャリアーとして用いることができるが、その際、他の病原性生物もしくは物質のエピトープに対する情報をもとに構築する。外来性エピトープ情報を担持する幾つかの修飾PRRSウイルスを混合し、一時に投与する。これにより、1種の病原の幾つかの異なるエピトープに対する活性な免疫を、または、幾つかの異なる病原に対する活性な免疫を可能とする。修飾PRRSVワクチン（非脱粒など）の安定性は包膜感染性ウイルスを産生するのに必要なこれらウイルスタンパクの情報削除することにより確実にすることができる。このウイルスは当該包膜タンパクを構成的に発現する細胞株で繁殖させねばならない。この相補的細胞株で複製するウイルスは完全な包膜を有し、ブタのマクロファージに感染させることができる。1回の複製サイクルの後、包膜タンパクの情報を欠いている孫のウイルスは、完全に包膜したウイルスのように最早他の細胞に感染することができない。体内のマクロファージ感染は裸のキャプシドとしてなお起こり得る。この様式で、当該ワクチンは予防接種した動物に包含され、他の動物には拡散しないこととなる。

図面の説明

図1．LVのゲノム長cDNAクローンの構築。上部（A）はcDNAクローンの融合を示し、pGEM-4Z中に以前に配列決定されたものである（ミューレンベルフ（Muelenberg）ら、1993a）。使用したクローンのpABV番号と制限部位を示す。黒棒は次クローニング工程で融合されるcDNAクローンのその部分を表す。R・T・で示した淡灰色棒はRT-PCRにより新たに生成したcDNAクローンであり、濃灰色棒はPCRにより新たに生成したcDNAクローンを表す。下部（B）は低コピー数ベクターpOK

10

20

30

40

50

12中の5'末端クローンpABV396をもつより大きなcDNAクローンpABV331/369、pABV384、およびpABV368を示し、T7 RNAポリメラーゼ・プロモーターおよびポリ(A)尾部をもつ3'末端クローンpABV395を包含している。pOK12多重クローニング部位の内側および外側の制限部位を示す。制限エンドヌクレアーゼ部位は以下のとおり：A、ApaI；Ap、ApoI；B、BamI；Bg、BglII；Bs、BspEI；Bc、BclI；E、EcoRI；Ec、EcoRV；H、HindIII；K、KpnI；N、NarI；Nc、NcoI；S、SacI；Sp、SpeI；Sa、SalI；Sc、ScaI；P、PstI；Pm、PmlI；X、XbaI；Xh、XhoI。

図2．クローン化全長LV cDNAおよび該cDNAクローンから転写された感染性RNAの末端配列。ゲノム長cDNAクローンをPvuIで線形化し、合成キャップ類似体 $m^7G(5')ppp(5')G$ の存在下T7 RNAポリメラーゼにより転写した。得られるRNAは5'端末に1個の余分のヌクレオチド(G)および3'末端に2個の余分のヌクレオチド(GC)を含んでいなければならない。RNA矢印は標準LV RNA配列に対応する5'および3'末端ヌクレオチドに対応する。

10

図3．LV野生型ウイルスTH、LV4.2.1、およびブタの肺胞マクロファージ(A)とCL2621細胞(B)中の組換えウイルスvABV414およびvABV416の増殖曲線。BHK-21細胞中に産生される組換えウイルスvABV414およびvABV416はいずれかを直接用いるか(BHK)、あるいはブタの肺胞マクロファージ(PAM)中で増幅後に用いた。THウイルスはブタの肺胞マクロファージ(PAM)中で調製し、一方、LV4.2.1はCL2621細胞(CL)中で調製した。細胞培養物を0.05のMOIで所定のウイルスにより感染させ、所定時点で採取した。ウイルスの力価(TCID₅₀/ml)はブタの肺胞マクロファージまたはCL2621細胞上、終点希釈法により決定した。

20

図4．LV感染性cDNAクローンへのユニークPacIおよびSwaI部位の導入。「材料と方法」の項で詳細に記載したように、PacIおよびSwaI部位をPCR指向変異誘発により創製した。PacIおよびSwaI部位を含むcDNAフラグメントをpABV414中に図示したそのユニークHpaIとXbaI部位を用いて交換した。これはそれぞれpABV437とpABV422に至った。

参考文献：

Benfield, D.A., E. Nelson, E. Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D.E., and Chladek, D.W. (1992).

Characterization of swine infertility and respiratory syndrome virus (Isolate ATCC-VR2332) *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 127-133.

Boyer, J., and Haenni, A. (1994) Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 198, 415-426.

10

Chen, Z., Faaberg, K.S., and Plagemann, P.G.W. (1994) Determination of the 5' end of the lactate dehydrogenase-elevating virus genome by two independent approaches. *J. Gen. Virol.* 75, 925-930.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (Isolate ATCC-VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. of Vet. Diagn. Invest.* 4, 117-126.

20

Conzelmann, K.K., Visser, N., van Woensel, P., and Tiel, H.J. (1993). Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. *Virology* 193, 329-339.

30

den Boon, J.A., Faaberg, K.S., Meulenberg, J.J.M., Wassenaar, A.L.M., Plagemann, P.G.W., Gorbalenya, A.E., and Snijder, E.J. (1995) Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. *J. Virol.* 69: 4500-4505.

Davis, N.L., Willis, L.V., Smith, J.F., and Johnston, R.E. (1989). In vitro synthesis of infectious Venezuelan equine encephalitis virus RNA of an insect virus. *Proc. Natl.*

40

Acad. Sci. USA 83, 63-66.

Deng, R., and Wu, R. (1981). An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 4173-4188.

Edwards, J.B.D.M., Delort, J., and Mallet, J. (1991) Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs; A new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 5227-5232. 10

Gorcycya, D., Schlesinger, K., Chladek, D., et al., (1995) *Proc. Am. Assoc. of Swine Pract., Ohama, NE*, 1-22.

Holy, S., and Abouhaidar, M.G. (1993). Production of infectious in vitro transcripts from a full-length clover yellow mosaic virus cDNA clone. *J. Gen. Virol.*, 74, 781-784.

Kim, H.S., Kwang, J., and Yoon, I.Y. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483. 20

Klump, W.M., Bergmann, I., Muller, B.C., Ameis, D., and Kandolf, R. (1990) Complete nucleotide sequence of infectious coxsackie-virus B3 cDNA: Two initial 5'uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 64, 1573-1583. 30

Lai, C.J., Zhao, B., Hori, H., and Bray, M. (1991) Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5139-5143. 30

Liljeström, P. and Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnol.* 9, 1356-1361.

Liljeström, P., and Garoff, H. (1993) Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors, p. 16.xx.1-16.xx.00 In: *Current protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl (Eds.). Greene Publishing 40

associates and Wiley interscience, New York.

Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.L.J.M., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G., and Moormann, R.J.M. (1993a). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) is related to LDV and EAV. *Virology* 192, 62-74.

Meulenberg, J.J.M., de Meijer, E.J., and Moormann, R.J.M. (1993b). Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved junction sequence. *J. of Gen. Virol.* 74, 1697-1701. 10

Meulenberg, J.J.M., Petersen-den Besten, A., de Kluyver, E.P., Moormann, R.J.M., Wensvoort, G (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206, 155-163.

Meulenberg, J.J.M., and Petersen-den Besten (1996) Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: The glycoprotein GP, encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. *Virology*, in press. 20

Meulenberg et al., 1997

Murtaugh, M.P., Elam, M.R., and Kakach (1995) Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.*, 140, 1451-1460.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E., and Benfield, D.A. (1993). Differentiation of United states and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. of Clin. Microbiol.* 31, 3184-3189. 30

Plagemann, P.G.W., and Moennig, V. (1991). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv. in Virus Res.* 41, 99-192. 40

Rice, C.M., Levis, R., Strauss, J.H., and Huang, H.V. (1987). Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones: mapping of lethal mutations, rescue of a

temperature-sensitive marker, and in vitro mutagenesis to generate defined mutants. *J. Virol.*, **61**, 3809-3819.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor NY.

Sarnow, P. (1989) Role of 3' end sequences in infectivity of polio-virus transcripts made in vitro. *J. Virol.*, **63**, 467-470.

10

Snijder, E.J., and Horzinek, M.C. (1993). Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2305-2316.

Spaan, W.J.M., Cavanagh, D., and Horzinek, M.C. (1988) Coronaviruses: Structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* **69**, 2939-2952.

Sumiyoshi, H., Hoke, C.H., and Trent, D.W. (1992). Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J. Virol.*, **66**, 5425-5431.

20

van Nieuwstadt, A.P., Meulenberg, J.J.M., van Essen-Zandbergen, A., Petersen-den Besten, A., Bende, R.J., Moormann, R.J.M., and Wensvoort, G. (1996). Proteins encoded by ORFs 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J. Virol.*, **70**, 4767-4772.

30

Viera, J., and Messing, J. (1991) New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene*, **100**, 189-194.

Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Luijtz, E.A., de Besten, A., Harris, L., Collins, J.E., Christianson, W.T., and Chladek, D. (1992) Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory (SIRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**, 134-138.

40

Wensvoort, G., Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M., and Van Zaane, D. (1986) Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* 12, 101-108.

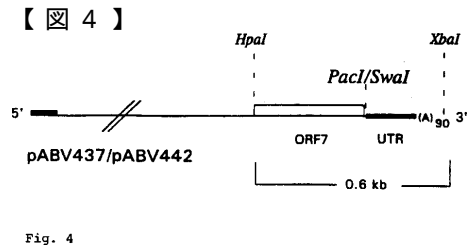
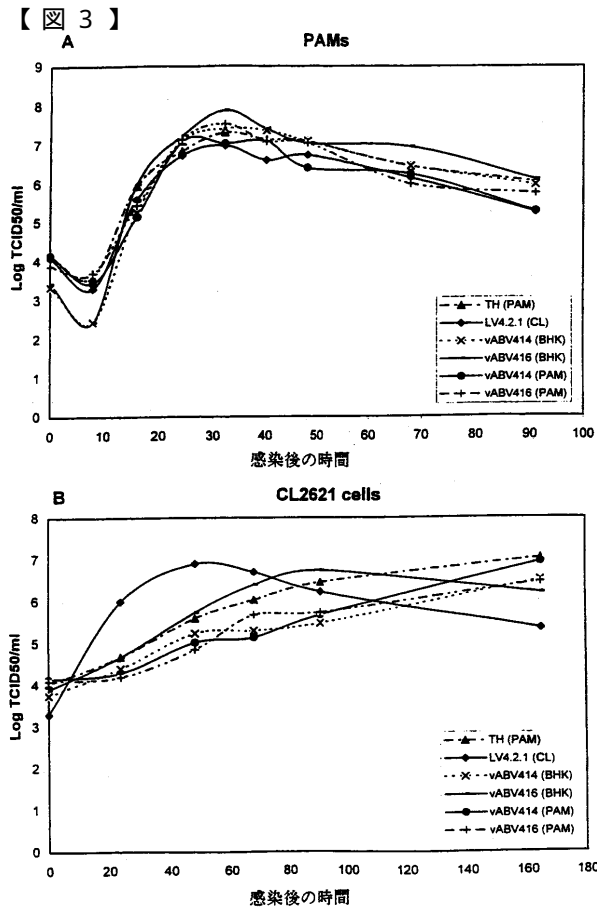
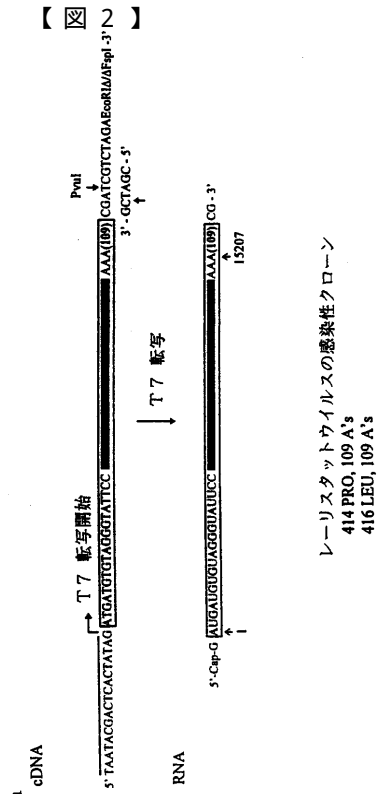
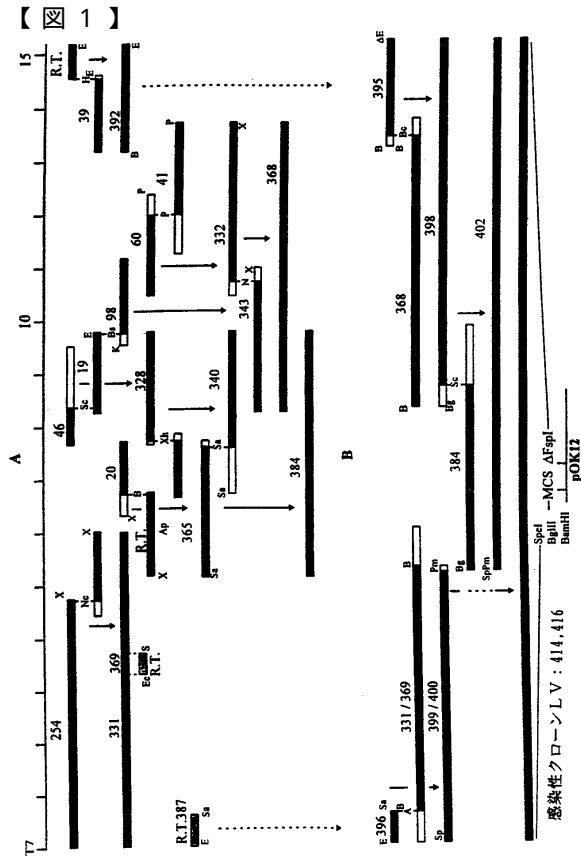
Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., Ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J.M., Moonen, P.L.J.M., Zetstra, T., de Boer, E.A., Tibben, H.J., de Jong, M.F., van 't Veld, P., Groenland, G.J.R., van Gennep, J.A., Voets, M.Th., Verheijden, J.H.M., and Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Quart.* 13, 121-130.

Zeng, L., Godeny, E.K., Methven, S.L., and Brinton, M.A. (1995) Analysis of simian hemorrhagic fever virus (SHFV) subgenomic RNAs, junction sequences and 5' leader. *Virology* 207, 543-548.

表1. LVの5'末端クローンのヌクレオチド配列

配列 1)	クローン数
ATGATGTGTAGGG.....	22
TGATGTGTAGGG.....	1
GATGTGTAGGG.....	2
ATGTGTAGGG.....	1

1) 下線を付したヌクレオチドは付加的配列を表し、以前に単離し、配列決定したcDNAクローン中には見出さなかったものである (ミューレンベルフ (Muelenberg) ら、1993a)。



フロントページの続き

- (72)発明者 ミューレンベルフ, ヨハンナ ヤコバ マリア
オランダ国 エヌエル—1 0 1 8 ベーベ— アムステルダム ラーフテ カデイク 1 7 ベー
- (72)発明者 ボル, ヨハネス マリア アントニウス
オランダ国 エヌエル—8 2 4 3 ハーアー レリスタット ヨル 3 0—0 5
- (72)発明者 ボス—デ リュエイテル, ジュディ ノーマ アレッタ
オランダ国 エヌエル—1 3 3 9 ハーデー アルメーレーバイテン ピーミント ホフ 4 5

審査官 森井 隆信

- (56)参考文献 Virology, 1 9 9 3 年, Vol.192, p.62-72
J.Virol., 1 9 9 8 年, Vol.72, No.1, p.380-387
Virology, 1 9 9 4 年, Vol.198, p.415-426
Arch. Virol. Suppl., 米国, 1 9 9 4 年, Vol.9, 441-448

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
A61K 39/12
A61P 37/04
C12N 5/10
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed