(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4036469号
(P4036469)
(45)発行日　平成20年1月23日(2008.1.23)　(24)登録日　平成19年11月9日(2007.11.9)

(51)Int.Cl.		F I	
C12N 15/00	(2006.01)	C12N	15/00
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/12
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00
C07K 14/045	(2006.01)	C07K	14/045
C12N 7/00	(2006.01)	C12N	7/00

請求項の数 5　(全 27 頁)

(21)出願番号　特願平8-506658
(86)(22)出願日　平成7年7月28日(1995.7.28)
(65)公表番号　特表平10-503378
(43)公表日　平成10年3月31日(1998.3.31)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/009607
(87)国際公開番号　WO1996/004383
(87)国際公開日　平成8年2月15日(1996.2.15)
審査請求日　平成14年7月22日(2002.7.22)
(31)優先権主張番号　08/282,696
(32)優先日　平成6年7月29日(1994.7.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
アメリカン・サイアナミド・カンパニー
アメリカ合衆国ニュージャージイ州０７９４０マデイソン・フアイブジラルダフアームス
(73)特許権者
ジ・イースタン・バージニア・メデイカル・スクール
アメリカ合衆国バージニア州２３５０１ノーフオーク・ピーオーボツクス１９８０・ザメデイカルカレツジオブ　ハンプトンローズ
(74)代理人
弁理士　小田島　平吉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＭＨＣクラスＩ重鎖発現のダウンレギュレーションに関わるヒトサイトメガロウイルス遺伝子領域の同定

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

感染することにより細胞の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩの発現をダウンレギュレーションしない組換えヒトサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）突然変異体であって、ＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーションを行うことが可能な遺伝子配列を欠失させたゲノムを含み、かつ、欠失遺伝子配列が読み取り枠ＩＲＳ１～ＵＳ１１を含む領域である、組換えＨＣＭＶ突然変異体。

【請求項２】

感染することにより細胞の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩの発現をダウンレギュレーションしない組換えヒトサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）突然変異体であって、ＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーションを行うことが可能な遺伝子配列を欠失させたゲノムを含み、かつ、欠失遺伝子配列が読み取り枠ＵＳ２～ＵＳ１１からなる、組換えＨＣＭＶ突然変異体。

【請求項３】

（ａ）サイトメガロウイルスのゲノムに含まれる読み取り枠ＩＲＳ１～ＵＳ１１領域内の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩ発現のダウンレギュレーションを行うことが可能である遺伝子配列を同定する段階：および

（ｂ）こうして同定された遺伝子配列をサイトメガロウイルスのゲノムから欠失させる段階：

を含んでなる、サイトメガロウイルス感染細胞内でＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレ

ーションを制御する方法。
【請求項４】
同定された遺伝子配列が読み取り枠ＩＲＳ１～ＵＳ９およびＵＳ１１を含むサイトメガロウイルスのゲノムの領域に由来する請求項３記載の方法。
【請求項５】
同定された遺伝子配列が読み取り枠ＵＳ２～ＵＳ１１を含むサイトメガロウイルスのゲノムの領域に由来する請求項３記載の方法。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、感染の際に細胞性ＭＨＣクラスＩ重鎖の発現のダウンレギュレーションを行わない組換え突然変異体ヒトサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）に関する。
発明の背景
ヒトサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）はベーターヘルペスウイルスであり、このウイルスは、免疫無防備状態および免疫抑制状態の成人、ならびに子宮内もしくは周産期に感染した一部の幼児に臨床的に重篤な疾患を引き起こす（Ａｌｆｏｒｄ ａｎｄ Ｂｒｉｔｔ、１９９０）。ＨＣＭＶの内の２３０－ｋｂのｄｓＤＮＡゲノムの配列が決定されており（Ｃｈｅｅ ｅｔ ａｌ．、１９９０）、そしてこれは少なくとも２００の読み取り枠（ＯＲＦ）を有する。本出願の目的のためには、読み取り枠は、一本のアミノ酸をコードし、そしてそのため、ある蛋白質をコードすることがある、ある遺伝子の部分として特定される。幾つかのＨＣＭＶ蛋白質の機能は既知であるか、もしくは他のウイルス性（特に、単純疱疹ウイルス）蛋白質および細胞性蛋白質との相同性に起因して予想されている。しかしながら過半数のＨＣＭＶ ＯＲＦについては、それらがコードする蛋白質の機能（一つもしくは複数）は未知である。
ＨＣＭＶ遺伝子機能を研究する目的では、ＨＣＭＶ欠失突然変異体を、それらのインビトロでの増殖特性を評価する目的で構築することができる（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．、１９９１；Ｊｏｎｅｓ ａｎｄ Ｍｕｚｉｔｈｒａｓ、１９９２）。この出願の目的のためには、欠失突然変異体は、野生型ウイルスゲノムの領域を喪失しているヒトサイトメガロウイルス突然変異体として特定される。この手法は、選択されたＨＣＭＶ遺伝子（一つもしくは複数）の、原核生物レポーター遺伝子（通常はβ－グルクロニダーゼ）による部位特異的置換突然変異誘発を必要とするが、グアノシンホスホリボシルトランスフェラーゼも用いることができる。この様式では置換されたウイルス遺伝子（一つもしくは複数）が非必須である場合にのみ組化えウイルスを単離することができる。
ＨＣＭＶによる感染によって細胞性ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションがもたらされることが多くの研究者により既に示されている（Ｂｒｏｗｎｅ ｅｔ ａｌ．、１９９０；Ｂｅｅｒｓｍａ ｅｔ ａｌ．、１９９３；Ｙａｍａｓｈｉｔａ ｅｔ ａｌ．、１９９３）。この適用法の目的のためにはダウンレギュレーションは、ＭＨＣクラスＩ重鎖の合成、安定性、もしくは表面発現の内のいずれかにおける調節として特定される。このような現象は既に幾つかの他のＤＮＡウイルスについて報告されており、それらのウイルスには、アデノウイルス、マウスサイトメガロウイルス、および単純疱疹ウイルスが含まれる（Ａｎｄｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．、１９８５；Ｂｕｒｇｅｔ ａｎｄ Ｋｖｉｓｔ、１９８５；ｄｅｌ Ｖａｌ ｅｔ ａｌ．、１９８９；Ｃａｍｐｂｅｌｌ ｅｔ ａｌ．、１９９２；Ｃａｍｐｂｅｌｌ ａｎｄ Ｓｌａｔｅｒ、１９９４；Ｙｏｒｋ ｅｔ ａｌ．、１９９４）。アデノウイルスおよび単純疱疹ウイルス系では、インビトロでの複製に可欠なウイルス性遺伝子の産物はＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションを引き起こすのに十分なものである。（Ａｎｄｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．、１９８５；Ｂｕｒｇｅｔ ａｎｄ Ｋｖｉｓｔ、１９８５）。マウスサイトメガロウイルスによるクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションに関わる遺伝子（一つもしくは複数）は未だに同定されていない。
発明の要約
本発明は、感染の際に細胞性ＭＨＣクラスＩ重鎖の発現のダウンレギュレーションを行わ

ない組換え突然変異体ヒトサイトメガロウイルスを提供する。読み取り枠ＩＲＳ－１～ＵＳ１１を含む組換えサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）突然変異体のゲノム領域において遺伝子配列の欠失が作製される。このような２つの突然変異体ＲＶ７９８およびＲＶ７９９は両者共読み取り枠ＵＳ２～ＵＳ１１を欠失しており、そしてＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションを行う能力を喪失している。

本発明は更に、サイトメガロウイルスに感染した細胞での主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩ発現のダウンレギュレーションを制御する、組換え突然変異体ヒトサイトメガロウイルスを利用する方法も提供する。

本発明は更に、組換え突然変異体ヒトサイトメガロウイルスを利用するワクチン、ならびにその組換え突然変異体ヒトサイトメガロウイルスの免疫原的量を投与することにより、ある個体での急性サイトメガロウイルスを予防するかもしくはそれに対する感受性を低下させる方法をも提供する。読み取り枠ＩＲＳ－１～ＵＳ１１を含む組換えサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）突然変異体のゲノムの領域内の遺伝子配列を喪失している生の弱毒化ＨＣＭＶワクチンは、前者によるクラスＩダウンレギュレーションの喪失という根拠に基づくと、この遺伝子領域を含むものよりも優れた免疫応答を誘導するであろう。従って、その領域を喪失しているウイルスは優れた免疫原となる。

本発明は更に、ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションに関わるＨＣＭＶ遺伝子をアデノウイルスベクターもしくは類似ウイルスに基づく遺伝子療法用ベクター内に取り込ませて免疫応答を最小限にさせることができる遺伝子療法用ベクターをも提供する。このことにより、組換えアデノウイルスもしくは類似ウイルスに基づく遺伝子療法用ベクターを遺伝子療法において用いるという使用が可能になるであろう。

本発明は、以下の図面の引用により一層完全に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

図１は、ＨＣＭＶ感染細胞における免疫蛍光－フローサイトメトリーによる細胞表面ＭＨＣクラスＩの検出を示す。ヒト包皮繊維芽細胞（ＨＦＦ）細胞は７２時間、５ＰＦＵ／細胞の感染多重度での表示されるウイルスで感染させた。その時点で細胞を１％パラホルムアルデヒド内で固定させ、そしてＨＬＡ－Ａ、Ｂ、Ｃ（Ｗ６／３２）に特異的な一次抗体もしくは対照マウスＩｇＧ（イソタイプ適合性）で、次いで二次ＦＩＴＣ－複合化ヤギ抗－マウスＩｇＧで染色した。パーセント陽性細胞率（総数5×10^3）および平均蛍光強度（ＭＦＩ）を前方角光散乱　対　ｌｏｇ－積算９０°光散乱を基に、Ｉｍｍｕｎｏ　Ｐｒｏｇｒａｍ、Ｃｏｕｌｔｅｒ　ＭＤＡＤＳ　Ｉを用いて算出した。

図２は、ＨＣＭＶ野生型株ＡＤ１６９感染細胞におけるＭＨＣクラスＩ重鎖の発現を示す。図２Ａはウエスタン（Ｗｅｓｔｅｒｎ）ブロット分析である。ＨＦＦ細胞は、感染させていないか（Ｕ）もしくは５ＰＦＵ／細胞の感染多重度で感染させた。感染後２４、４８、および７２時間目に全細胞蛋白質を回収し、１５％ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルを通して電気泳動させ、ニトロセルロースにエレクトロブロットさせ、そしてＥＣＬ化学ルミネセンス検出用キット（Ａｍｅｒｓｈａｍ社）を用いてＴＰ２５．９９マウスモノクローナル抗体（ＭＨＣクラスＩ重鎖上の非コンフォメーション的エピトープに特異的なもの）で探索した。図２ＢおよびＣは免疫沈降分析である。ＨＦＦ細胞は、感染させていないか、もしくは感染させてあり（先の要領で）（この感染は、ホスホノフォルメートの非存在下もしくは存在下（＋ＰＦＡ）のいずれかで実施された）、そして感染後後期で４時間（６９～７３時間目）（図２Ｂ）もしくは感染後の表示時間で２時間（図２Ｃ）のいずれかの期間に放射ラベル化させた。蛋白質を放射ラベル化後即座に回収し、そしてクラスＩ重鎖をＴＰ２５．９９マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈降させた。

図３は、組換えウイルスゲノムの構成を示す。図３Ａ（最初のライン）は、ＨＣＭＶ野生型ゲノムの総体的構成の概略図である。非反復領域配列がラインにより示される一方で、反復領域配列は斜線付き横棒により示される。適切なＨｉｎｄＩＩＩ断片（これはＬ構成成分とＳ構成成分との中に含まれる）が文字表示により示される（Ｏｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．、１９８２）。二番目のラインはＳ構成成分の内の野生型ＨｉｎｄＩＩＩ－Ｑ、－Ｘ、－Ｖ領域の拡大図である。有意な読み取り枠、およびそれらの配向が白抜き横棒として示

される（Ｃｈｅｅ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０）。ＩＲs反復配列の位置が斜線付き横棒により表される。ＨｉｎｄＩＩＩ（Ｈ）およびＸｈｏＩ（Ｘ）の制限エンドヌクレアーゼ部位の位置が示される。図３Ｂ－Ｉは、表示されるＨＣＭＶ突然変異体のゲノム構成を示す。各場合共、最初のラインはＡＤ１６９野生型ゲノムの構成であり、第二ラインは組換えウイルスを作製するのに用いられる直線化プラスミドの適切な配列の構成を表す。斜めに引かれたラインは所望される突然変異体を作製するための相同組換えに関わることがあるウイルス性フランク配列の境界線を示す。欠失させた領域は最初のラインの下にある黒塗り横棒により示される。図３ＪはＲＶ７９９の起源および構成を示す。最初の２つのラインは図３Ｂ－Ｉと同一の表示であり、第三のラインはＲＶ１３４親からＲＶ７９９を作製するのに用いられる直線化させたプラスミドの適切な配列の組成を表す（二番目のライン）。

図４Ａ～Ｃは、ＨＣＭＶ突然変異体で感染させた細胞内での重鎖発現の分析を示す。ＨＦＦ細胞は感染させていないか（Ｕ）、もしくは表示されるウイルスで感染させてあり（５ＰＦＵ／細胞の感染多重度）、そして感染後後期に４時間（６９～７３時間目）放射ラベル化させた。蛋白質は放射ラベル化後即座に回収した。図４Ａは、ＴＰ２５．９９マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈殿させたクラスＩ重鎖の放射線写真である。図４Ｂは、ほぼ等しい放射性ラベル化効率を確認するための放射ラベル化させた全蛋白質の放射線写真である。図４Ｃは、ウイルス複製周期を通過する同一の進行状況を確認するための放射線写真である。ＵＬ８０蛋白質は抗－アセンブリー蛋白質ウサギポリクローナル抗血清を用いて免疫沈降させた。

図５Ａ～Ｃは、ＲＶ７９８－、ＲＶ７９９－、ＲＶ１３４－、もしくはＡＤ１６９野生型に感染させた細胞からのクラスＩ重鎖の免疫沈降を示す。ＨＦＦ細胞は感染させていない（Ｕ）か、もしくは表示されるウイルスで感染させてあり（５ＰＦＵ／細胞の感染多重度）、そして感染後後期に２時間（７１～７３時間目）放射ラベル化させた。蛋白質は放射ラベル化後即座に回収した。図５Ａは、ＴＰ２５．９９マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈降化させたクラスＩ重鎖の放射線写真である。等価な放射ラベル化効率（図５Ｂ）およびウイルス複製周期を通過する進行状況（図５Ｃ）を図４ＢおよびＣについて記載される要領で確認した。

図６は、ＲＶ７９８で感染させた細胞内で合成されるクラスＩ重鎖のエンドグリコシダーゼＨに対する感受性を示す放射線写真である。ＨＦＦ細胞をＲＶ７９８で感染させ（５ＰＦＵ／細胞の感染多重度）、そして感染後初期（６～８時間目）もしくは感染後後期（８０～８２時間目）に２時間放射ラベル化させた。比較目的で、感染させていない細胞を２時間放射ラベル化させた。蛋白質は、放射ラベル化後即座に（パルス（ｐｕｌｓｅ））か、もしくは２時間のチェイス（チェイス（ｃｈａｓｅ））の後のいずれかに、ラベル化されていない完全培地内で回収した。クラスＩ重鎖はＴＰ２５．９９マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈殿させた。免疫沈降化させた蛋白質を１．５ｍＵのエンドグリコシダーゼＨの存在下（＋）もしくは非存在下（－）のいずれかで６時間インキュベートしてから、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびフルオログラフィーを実施した。

図７Ａ～Ｃは、ＲＶ７９８－、ＲＶ７１８１－、ＲＶ７１７７－、もしくはＡＤ１６９野生型に感染させた細胞からのクラスＩ重鎖の免疫沈降を示す。ＨＦＦ細胞は感染させていない（Ｕ）か、もしくは表示されウイルスで感染させてあり（５ＰＦＵ／細胞の感染多重度）、そして感染後後期に２時間（６５～６７時間目）放射ラベル化させた。蛋白質を放射ラベル化後即座に回収した。図７Ａは、ＴＰ２５．９９マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈降化させたクラスＩ重鎖の放射線写真である。等価な放射ラベル化効率（図７Ｂ）およびウイルス複製周期を通過する進行状況（図７Ｃ）を図４ＢおよびＣについて記載される要領で確認した。

図８Ａ～Ｄは、免疫蛍光法による感染細胞内でのＵＳ１１遺伝子産物（ｇｐＵＳ１１）の局在化を示す写真である。ＨＦＦ細胞は感染させていないか、あるいは５ＰＦＵ／細胞の感染多重度でＡＤ１６９野生型もしくはＲＶ６９９（ＵＳ１１遺伝子の欠失が生じている）のいずれかで感染させた。８時間後に、感染させていない細胞および感染させた細胞を

４％パラホルムアルデヒドで固定化させた。その後に幾つかの細胞について０．２％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で透過性処理を施した。一次抗体はＵＳ１１融合蛋白質に対して作製されたウサギポリクローナル抗血清であった（Ｊｏｎｅｓ　ａｎｄ　Ｍｕｚｉｔｈｒａｓ、１９９１）。蛍光はＺｅｉｓｓ顕微鏡を通して可視化させた。

図９Ａ～Ｄは、ＨＣＭＶ突然変異体で感染させた細胞における重鎖発現の感染後初期での分析を示す。ＨＦＦ細胞は感染させていない（Ｕ）か、もしくは表示されるウイルスで感染させてあり（５ＰＦＵ／細胞の感染多重度）、そして感染後後期に４時間（６～１０時間目）放射ラベル化させた。蛋白質を放射ラベル化後即座に回収した。図９Ａは、ＴＰ２５．９９マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈降化させたクラスＩ重鎖の放射線写真である。図９Ｂは、おおよそ同等の感染であることを確認するために７２－ｋＤａのＩＥ１の即時初期蛋白質をマウスモノクローナル抗体９２２１を用いて免疫沈降させた放射線写真である。図９Ｃは、この糖蛋白質のおおよそ等価な発現を確認するための、マウスモノクローナル抗体Ｂｅｒ－Ｔ９での細胞性トランスフェリンレセプターの免疫沈降の放射線写真である。図９Ｄは、おおよそ等量の放射性ラベル化効率を確認するための、放射線ラベル化させた全蛋白質の放射線写真である。

図１０は、野生型および突然変異体のＨＣＭＶで感染させたＨＦＦ細胞からのＭＨＣクラスＩ重鎖発現データのまとめを提供する。最初のラインはＨＣＭＶ野生型ゲノムの総体的構成であり、そして第二ラインはＳ構成成分の野生型Ｈｉｎｄ ＩＩＩ－Ｑおよび－Ｘ領域の拡大図である。ＯＲＦは斜線なしの横棒により示され：ラベル化されていないＯＲＦ重複性のＵＳ４およびＵＳ５はＵＳ４．５である。様々なＨＣＭＶ突然変異体内での欠失は斜線付き横棒により示される。ＲＶ６７０はＩＲＳ１～ＵＳ９およびＵＳ１１を欠失しており；ＲＶ３５はＵＳ６～ＵＳ１１を欠失しており；ＲＶ６７はＵＳ１０～ＵＳ１１を欠失しており；ＲＶ８０はＵＳ８～ＵＳ９を欠失しており；ＲＶ７２５はＵＳ７を欠失しており；ＲＶ６９はＵＳ６を欠失しており；ＲＶ４７はＵＳ２～ＵＳ３を欠失しており；ＲＶ５１２２はＵＳ１を欠失しており；ＲＶ４６はＩＲＳ１を欠失しており；ＲＶ７９８はＵＳ２～ＵＳ１１を欠失しており；ＲＶ７１８１はＩＲＳ１～ＵＳ９を欠失しており；ＲＶ７１７７はＩＲＳ１～ＵＳ６を欠失しており；そしてＲＶ７１８６はＩＲＳ１～ＵＳ１１を欠失している。ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションの結果は、免疫沈降実験によるものであり（重鎖コンホメーション非依存的モノクローナル抗体、ＴＰ２５．９９、を用いる）、その実験ではＨＣＭＶに感染したＨＦＦ細胞を感染後後期に放射ラベル化させた。最後のラインは、ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションにとって十分な遺伝子（一つもしくは複数）を含む２つの小領域の位置を示す。小領域ＡはＯＲＦ　ＵＳ２～ＵＳ５（塩基１９３１１９－１９５６０７）を含み、そして小領域ＢはＯＲＦ　ＵＳ１０およびＵＳ１１（塩基１９９０８３－２００３６０）を含む。

図１１Ａ～Ｂは、ＨＣＭＶ　ＵＳ１１遺伝子を発現する細胞株のウエスタンブロット（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｓ）である。感染させていないヒトＵ３７３－ＭＧ神経膠星状細胞腫細胞（これはＵＳ１１発現プラスミドで安定な状態で形質転換させてある）を、各々、ＭＨＣクラスＩ重鎖発現（図１１Ａ）について、およびＵＳ１１発現（図１１Ｂ）について、ＴＰ２５．９９モノクローナル抗体およびＵＳ１１ポリクローナル抗血清を用いるウエスタン（Ｗｅｓｔｅｒｎ）ブロット分析により分析した。

好ましい態様の記述

一群のウイルス性遺伝子の代わりにマーカー遺伝子（β－グルクロニダーゼ）を発現する、ＲＶ６７０と称される組換えＨＣＭＶ突然変異体が既に構築されている。この突然変異体でのヒト繊維芽細胞の感染の際には、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩ重鎖の発現は、野生型ＨＣＭＶがこれらの細胞を感染する場合程には減少しない。

野生型ＨＣＭＶとは異なり、本発明のウイルスは細胞性ＭＨＣクラスＩ重鎖蛋白質発現のダウンレギュレーションはもたらさない。重鎖発現のダウンレギュレーションに必要とされる遺伝子を含むＨＣＭＶゲノムの７ｋｂの領域が本発明で利用される。

当業者は、効率のよい細胞媒介性免疫応答のために細胞障害性Ｔ－リンパ球前駆体を活性化および拡張させるためには効率のよい抗原のプロセシングおよび提示が必要とされるこ

とを認識するであろう。効率のよい抗原提示には感染期間中を通しての継続的ＭＨＣクラスＩ蛋白質発現が必要である。ＲＶ６７０での細胞の感染は、クラスＩ重鎖の継続的発現をもたらす。
当業者は、類似遺伝子の欠失を有するウイルス（ＲＶ６７０）もしくは他のヒトサイトメガロウイルスを利用して効果的な生ワクチンを産生することができ、それはクラスＩ重鎖がＲＶ６７０に感染した細胞内では非感染細胞内の場合と同様に依然として発現され、そしてそのため細胞障害性Ｔ細胞応答を開始させる目的でのウイルス抗原提示が生じるためであることを認識するであろう。
本発明ではフローサイトメトリーおよび免疫蛍光の実験により、ＨＣＭＶ野生型株８１６９に感染したＨＦＦ細胞内ではクラスＩ重鎖の細胞表面発現は、感染後後期に多大に減少することが確認された。放射線ラベル化免疫沈降実験により、新規に合成されたＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションは感染後非常に初期に開始され（３時間目）、感染の期間中を通して生じることが示された（図２Ｃ）。この減少は翻訳後レベルでのものであり：クラスＩ重鎖は、ＨＣＭＶに感染した細胞内では非感染細胞内でのものと比較して一層高い回転率を有することが既に報告されている（Ｂｅｅｒｓｍａ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３）。クラスＩ重鎖のこのような不安定性はＨＣＭＶ感染に対する細胞媒介性免疫応答の低下をもたらすが、それはウイルス性ペプチドの提示が非効率的であるためであろう。従って、クラスＩ重鎖発現の減少は、ＨＣＭＶによる持続性もしくは潜伏性の感染の確立の際の宿主の免疫系の回避という点では重要である（Ｇｏｏｄｉｎｇ、１９９２）。
我々は組織培養物中でのウイルス複製にとっては可欠である１８のＯＲＦを提示するＨＣＭＶ突然変異体のバンクを、ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションを引き起こすそれらの能力についてスクリーニングした。ＯＲＦ　ＵＳ２～ＵＳ１１（塩基１９３１１９－２００３６０）を含むＨＣＭＶゲノムのＳ構成成分の内の７ｋｂ領域は、この表現型にとって必要とされる遺伝子を含むことが明確に示された（データは図１０にまとめられている）。この領域内には２つの小領域が存在し、その各々は重鎖のダウンレギュレーションにとって十分な遺伝子を含む。
小領域ＡはＯＲＦ　ＵＳ２～ＵＳ５（塩基１９３１１９－１９５６０７）を含む。ＵＳ２およびＵＳ３が膜糖蛋白質をコードすることが既に提案されている（Ｃｈｅｅ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０）。ＵＳ３は特異的スプライシングを受けた遺伝子であり、この遺伝子はウイルス複製周期中を通して発現され、かつ転写性トランス作用性機能を有する蛋白質をコードする（Ｔｅｎｎｅｙ　ａｎｄ　Ｃｏｌｂｅｒｇ－Ｐｏｌｅｙ、１９９１；Ｃｏｌｂｅｒｇ－Ｐｏｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．、１９９２；Ｔｅｎｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３；Ｗｅｓｔｏｎ、１９８８）。数々のより小さ目のＯＲＦもこの小領域内に存在するが（ＯＲＦ　ＵＳ３とＵＳ５との間）、それらの発現特性および機能は未だに報告されていない。ＧｒｅｔｃｈおよびＳｔｉｎｓｋｉ（１９９０）は、ＨＣＭＶゲノムのこの領域から転写される１．０－ｋｂの初期ｍＲＮＡが存在することを報告したが、これについては詳細なマッピングはなされてはいなかった。これらの遺伝子の内のいずれのものが重鎖のダウンレギュレーションに関わっているのかは未だに知られてはいない。
小領域ＢもＭＨＣクラスＩ重鎖にとっては十分なものであり、この領域はＵＳ１０およびＵＳ１１の遺伝子（図１０）（塩基１９９０８３－２００３６０）を含む。しかしながら、野生型レベルのＵＳ１０遺伝子産物を発現するＨＣＭＶ突然変異体ＲＶ６７０を用いるデータに基づくと、ＵＳ１０の発現は重鎖発現のダウンレギュレーションにとっては十分ではない（図２Ｂ）。この遺伝子データにより、ＵＳ１１遺伝子産物が必要とされることが暗示された。我々は既に、ＵＳ１１の発現は、他のＭＣＮＶ蛋白質の非存在下では、安定に形質転換されながらも感染させていない細胞内においてはＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションを生じるのに十分であることを示している（図１１）。これらのＯＲＦの両方からのＲＡＮおよび蛋白質の発現は初期に開始され、そして感染の期間中ずっと進行し（Ｊｏｎｅｓ　ａｎｄ　Ｍｕｚｉｔｈｒａｓ、１９９１）；ＵＳ１０およびＵＳ１１は各々２２－ｋＤａ（ｇｐＵＳ１０）および３２－ｋＤａ（ｇｐＵＳ１１）の糖蛋白質をコードし；両方の糖蛋白質はエンドグリコシダーゼＨに対する完全な感受性を示すＮ－

連結された糖残基を有する。これらの糖蛋白質は小胞体およびシスゴルジ体内に留まっている。ｇｐＵＳ１１が細胞表面上では検出されなかったが、ＨＣＭＶに感染した細胞の細胞質内に検出されたという免疫蛍光法からのデータはこの結論と一致する（図８）。ＨＣＭＶ　ｇｐＵＳ１１（およびｇｐＵＳ１０）の特徴は、アデノウイルスタイプ２のＥ３領域からコードされる２５ｋＤａの糖蛋白質（Ｅ３－１９Ｋ）に類似する。Ａｄ　Ｅ３－１９Ｋはウイルス複製にとっては非必須である。これはエンドグリコシダーゼ　Ｈ－感受性Ｎ－連結糖残基を含み、小胞体内に留まり、かつＭＨＣクラスＩ重鎖に結合し、そのことによりその重鎖の細胞表面への輸送を妨害することが既に示されている（Ａｎｄｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、１９８５；Ｂｕｒｇｅｒｔ　ａｎｄ　Ｋｖｉｓｔ、１９８５）。Ａｄ　Ｅ３－１９Ｋとは対照的に、ｇｐＵＳ１１（もしくはｇｐＵＳ１０）と、クラスＩ重鎖との間の直接会合（例えば、免疫共沈殿による）は検出されなかった（データ非公開）。ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションにとって必要とされるＨＣＭＶゲノムの領域としてのＵＳ２～ＵＳ１１遺伝子領域の同定は様々な点で重要である。先に記載されるように、感染の期間中を通してのゲノムのこの領域からの発現は効率のよい細胞媒介性免疫応答を妨害するように作用する。細胞障害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）前駆体集団を活性化および拡張させるための抗原提示にとってはＭＨＣクラスＩ分子の表面発現が必要とされる（Ｓｃｈｗａｒｔｚ、１９８５）。それに加え、それらは更に、活性化されたＣＴＬによる標的認識にとっても必要とされる（Ｚｉｎｋｅｒｎａｇｅｌ　ａｎｄ　Ｄｏｈｅｒｔｙ、１９８０）。ＭＣＭＶでは、主要な即時初期蛋白質に対するＣＴＬはこのウイルスによる致死的感染に対する保護となる（Ｊｏｎｊｉｃ　ｅｔ　ａｌ．、１９８８）。しかしながらＨＣＭＶに感染した個体では、類似のＨＣＭＶ即時初期蛋白質ＩＥ１に対するＣＴＬの出現頻度は極めて稀であることが報告されている（Ｇｉｌｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３）。最近の研究により、ＩＥペプチドはインターフェロン－γで処理したＨＣＭＶ感染細胞によるほうが未処理の感染細胞によるよりも一層効果的に提示されることが既に示されている（Ｇｉｌｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３）。インターフェロンμはＭＨＣクラスＩ蛋白質の表面発現の増大をもたらす。従って、ＨＣＭＶ感染細胞におけるクラスＩ重鎖の発現の増加は、他の重要なＨＣＭＶ抗原に対するＩＥ－特異的ＣＴＬもしくはＣＴＬの効果的作製の際には重要であることがある。ＵＳ２～ＵＳ１１遺伝子領域が欠失しているＨＣＭＶ突然変異体がこの効果を有するであろうが、それはクラスＩ重鎖は細胞がこの突然変異体で感染する場合にはダウンレギュレーションを受けないためである。従って、ウイルスゲノムのこの領域の欠失は、効率のよい抗－ＨＣＭＶ免疫応答を誘導するための生のＨＣＭＶワクチンの開発には重要である。

数年前に、ＨＣＭＶ　ＵＬ１８　ＯＲＦがＭＨＣクラスＩ重鎖に類似する蛋白質をコードすることが報告された（Ｂｅｃｋ　ａｎｄ　Ｂａｒｒｅｌｌ、１９８８）。ＨＣＭＶ感染細胞内での重鎖のダウンレギュレーションは、β２－ミクログロブリンについてのＵＬ１８遺伝子産物の競合に起因し、このことによりクラスＩ重鎖およびβ２－ミクログロブリンの通常の会合が効果的に妨害されることが仮定された（Ｂｒｏｗｎｅ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０）。この仮説は、ＵＬ１８の欠損を生じているＨＣＭＶ突然変異体が重鎖発現のダウンレギュレーションを行う能力を保持している際には本質的に除外された（Ｂｒｏｗｎｅ　ｅｔ　ａｌ．、１９９２）。ＵＬ１８遺伝子産物は、数々のＨＣＭＶ遺伝子の内で、その遺伝子の発現がこの表現型にとって十分である唯一のものであるという可能性は依然として残されている。しかしながら本発明のデータにより、クラスＩ重鎖のダウンレギュレーションにとってはＵＳ２～ＵＳ１１領域内の遺伝子のみで十分であることが示される。

ＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーションをもたらす２つの独立なメカニズムの存在により、首尾良い感染および宿主内での持久性についてのこの表現型の重要性が強調される。一つのメカニズムは他のもののためのバックアップ系として作用することがあるが、しかし各系に特異的な細胞タイプが存在するということも理にかなっている。ＨＦＦ細胞系の場合には両システムが機能的である。しかしながらＵ３７３－ＭＧ細胞では、重鎖発現のダウンレギュレーションは小領域Ａの存在に依存する程度が一層高い。この場合には

、小領域Ｂ遺伝子領域と相互作用を行う細胞性蛋白質に質的もしくは量的な差異が存在することがある。類似の状況が単純疱疹ウイルス系に存在する。８８アミノ酸のＵＳ２１遺伝子産物（ＩＣＰ４７）が小胞体内に留まるクラスＩ重鎖にとって十分なものであることが報告されたのは最近のことである（Ｙｏｒｋ　ｅｔ　ａｌ．、１９９４）。しかしながら重鎖の発現は単純疱疹ウイルス感染マウス細胞内では冒されてはいないものの、ＩＣＰ４７がそれらの細胞内で発現され、かつマウス重鎖はＨＳＶ感染ヒト繊維芽細胞系内で発現される際にはダウンレギュレーションを受ける（Ｙｏｒｋ　ｅｔ　ａｌ．、１９９４）。

ゲノムが、感染細胞内でのＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーションを行うことが可能な遺伝子配列を完全に欠損している、本発明の組換えＨＣＭＶ突然変異体を含む薬剤学的組成物が調製されることがある。安定剤もしくは他の適切な賦形剤がこの薬剤学的組成物に利用されることがある。

初期に論議されたように、ＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーションを行うことが可能な遺伝子配列を完全に欠損する本発明の組換えＨＣＭＶ突然変異体が、サイトメガロウイルス感染の予防のためのワクチンに用いられることがある。このワクチンは、薬剤学的に許容される賦形剤中に、その組換えＨＣＭＶ突然変異体の有効量を含む。場合によってアジュバンドがこのワクチンに添加されることがある。

ある個体をサイトメガロウイルスに対して免疫化させる方法は、その個体に、ＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーションを行うことが可能な遺伝子配列を完全に欠失する本発明の組換えＨＣＭＶ突然変異体の免疫原的な量を投与することにより実施されることがある。

ある個体における急性サイトメガロウイルスを予防するかもしくはそれに対する感受性を低下させる方法は、ＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーションを行うことが可能な遺伝子配列を完全に欠失している本発明の組換えＨＣＭＶ突然変異体の免疫原的量をその個体に投与することにより実施されることがある。

サイトメガロウイルス感染細胞におけるＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーションは、主要組織適合遺伝子複合体のダウンレギュレーションを行うことが可能な遺伝子配列を同定する段階、およびその同定された遺伝子配列をサイトメガロウイルスゲノムから欠失させる段階を有する方法により制御されることがある。

初期に論議されたように、ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションに関わる遺伝子配列を、アデノウイルスベクターもしくは類似のウイルスに基づく遺伝子療法用ベクター内に取り込ませて免疫応答を最小限にさせ、かつ遺伝子療法におけるそのベクターの使用を可能にさせることができる。ウイルスに基づく、ある遺伝子療法用ベクターは、ＵＳ１１の読み取り枠の遺伝子配列を含む。ウイルスに基づくもう一つの遺伝子療法用ベクターは、小領域ＡおよびＢの遺伝子配列を含む（各々、読み取り枠ＵＳ２～ＵＳ５およびＵＳ１０～ＵＳ１１）。

実施例１

ウイルスおよび細胞

ＨＣＭＶ株ＡＤ１６９は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから取得され、かつ当業者に知られる標準的プロトコールにより継代される。ヒト包皮繊維芽細胞（ＨＦＦ）細胞は当研究室で単離され、そしてこれを第１２継代以降で用いる（Ｊｏｎｅｓ　ａｎｄ　Ｍｕｚｉｔｈｒａｓ、１９９１）。これらは，１０％のウシ胎仔血清および２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳを含むダルベッコー（Ｄｕｌｂｅｃｃｏｓ）の改変イーグル（Ｅａｇｌｅ）培地（ＤＭＥＭ）内で増殖させた。

ＤＮＡ配列

ＨＣＭＶ株ＡＤ１６９のＤＮＡ配列（Ｇｅｎｅｂａｎｋ　受託番号第Ｘ１７４０３号）のＣｈｅｅら（１９９０）の番号付けシステムが本発明に用いられる。

プラスミド

ＨＣＭＶ突然変異体の作製のために用いられたプラスミドは既に記載される方法を用いて構築された（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１；Ｊｏｎｅｓ　ａｎｄ　Ｍｕｚｉｔｈ

ｒａｓ；１９９２）。一般的にはβ－グルクロニダーゼレポーター遺伝子は各端で１．５ｋｂのＨＣＭＶ配列によって囲まれている（この配列はそのウイルスから欠失させる予定の遺伝子（一つもしくは複数）をフランクしている）。各事例においてプラスミドＤＮＡを、原核生物主鎖内での切断を行う制限酵素で直線化させ、それからトランスフェクションを実施する。ＨＣＭＶ株ＡＤ１６９ゲノムＤＮＡ断片は、各々ＨｉｎｄＩＩＩ－Ｇ（塩基１７６８４４－１９５８３７）、－Ｘ（塩基１９５８３７－２００８５６）、およびＸｂａＩ－Ｐ（塩基２００３９１－２０６４１４）のＤＮＡ断片を含むｐＨｉｎｄ－Ｇ、ｐＨｉｎｄ－Ｘ、もしくはｐＸｂａ－Ｐのいずれかに由来する（Ｏｒａｍ　ｅｔ　ａｌ．、１９８２；Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９８１）。ｐＵＳ７／ＵＳ３は、ｐＨｉｎｄ－ＧおよびｐＨｉｎｄ－Ｘに由来する１．７－ｋｂのＰｓｔＩ－ＰｓｔＩ　ＨＣＭＶ断片（ｐＩＢＩ３０ベクター［Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．社］中の塩基１９６４４７－１９４７４１）を含んでいた。

ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ１１～ＩＲＳ１をβ－グルクロニダーゼにより置換するために（すなわち、ＲＶ７１８６；図３）、ｐＢｇｄＵＳ１１／ＩＲＳ１を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．８ｋｂのＰｓｔＩ－ＸｂａＩ断片（塩基２０２２０７～２００３９１、ｐＸｂａ－ＰからのＵＳ１３、ＵＳ１２、およびＵＳ１１プロモーター配列を含む）、β－グルクロニダーゼ、初期および後期ポリアデニル化シグナルを含む２８８－ｂ　ＳＶ４０断片（ｐＲｃＣＭＶ［Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社］からのもの）、ならびに１．７－ｋｂのＮｃｏＩ－ＮｃｏＩ断片（塩基１８９７６３～１８８０６２、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＪ１Ｉ～ＩＲＬ１配列を含む）を含んでいた。

ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ１１～ＵＳ２をβ－グルクロニダーゼにより置換するために（すなわち、ＲＶ７９８；図３）、ｐＢｇｄＵＳ１１／ＵＳ２を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．８ｋｂのＰｓｔＩ－ＸｂａＩ断片（塩基２０２２０７～２００３９１、ｐＸｂａ－ＰからのＵＳ１３、ＵＳ１２、およびＵＳ１１プロモーター配列を含む）、β－グルクロニダーゼ、ＵＳ１０ポリアデニル化シグナルを含む２５５－ｂ断片（塩基１９９２７６～１９９０２１、ｐＨｉｎｄ－Ｘからのもの）、ならびに１．３－ｋｂのＮｈｅＩ－ＡｐａＩ断片（塩基１９３３６０～１９２０３３、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＣ－末端ＵＳ２～ＩＲＳ１配列を含む）を含んでいた。

ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ１１～ＵＳ６をβ－グルクロニダーゼにより置換するために（すなわち、ＲＶ３５；図３）、ｐＢｇｄＵＳ１１／ＵＳ６を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．８ｋｂのＰｓｔＩ－ＸｂａＩ断片（塩基２０２２０７～２００３９１、ｐＸｂａ－ＰからのＵＳ１３、ＵＳ１２、およびＵＳ１１プロモーター配列を含む）、β－グルクロニダーゼ、ならびに１．５－ｋｂのＨｐａＩ－ＳｓｔＩＩ断片（塩基１９５５８９～１９４０６２、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＣ－末端ＵＳ６～ＵＳ３配列を含む）を含んでいた。ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ１１～ＵＳ１０もしくはＯＲＦ　ＵＳ１１（単独）のβ－グルクロニダーゼによる置換（すなわち、各々ＲＶ６７およびＲＶ６９９）は既に記載されている（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１）。

ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ９～ＩＲＳ１をβ－グルクロニダーゼにより置換するために（すなわち、ＲＶ７１８１；図３）、ｐＢｇｄＵＳ９／ＩＲＳ１を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．１ｋｂのＳａｌＩ－ＡｐａＩ断片（塩基２００１７１～１９９０２１）、３５１－ｂのＳＶ４０初期プロモーター（ｐＲｃＣＭＶからのもの）、β－グルクロニダーゼ、２８８－ｂのＳＶ４０ポリアデニル化シグナル断片、ならびに１．７－ｋｂのＮｃｏＩ－ＮｃｏＩ断片（塩基１８９７６３～１８８０６２、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＪ１Ｉ～ＩＲＬ１配列を含む）を含んでいた。

ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ６～ＩＲＳ１をβ－グルクロニダーゼにより置換するために（すなわち、ＲＶ７１７７；図３）、ｐＢｇｄＵＳ６／ＩＲＳ１を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．７ｋｂのＮｃｏＩ－ＮｃｏＩ断片（塩基１８８０６２～１８９７６３、ｐＨｉｎｄ－GからのＩＲＬ１、Ｊ１Ｉ、およびＩＲＳ１プロモーター配列を含む）、β－グルクロニダーゼ、ＵＳ１０ポリアデニル化シグナルを含む２５５－ｂ断片（ｐＨｉｎｄ－Ｘからの塩基１９９２７６～１９９０２１）、ならびに１．８－ｋｂのＢｓｍＩ

－ＳａｕＩ断片（塩基１９６２２２～１９８０３０、ｐＨｉｎｄ－ＸからのＵＳ７～Ｃ－末端ＵＳ９配列を含む）を含んでいた。
ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ３～ＵＳ２をβ－グルクロニダーゼにより置換するために（すなわち、ＲＶ４７；図３）、ｐＢｇｄＵＳ３／ＵＳ２を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．７ｋｂのＰｓｔＩ－ＰｓｔＩ断片（塩基１９９６４４７～１９４７４１）、ＨＳＶ－１　ｇＨプロモーター（ＭｃＫｎｉｇｈｔ、１９８０）を含む１８０－ｂのＳｍａＩ－ＨａｅＩＩＩ、β－グルクロニダーゼ、２５５－ｂのＵＳ１０ポリアデニル化シグナル断片、ならびに１．３－ｋｂのＮｈｅＩ－ＡｐａＩ断片（塩基１９３３６０～１９２０３３、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＣ－末端ＵＳ２～ＩＲＳ１配列を含む）を含んでいた。
ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ１をβ－グルクロニダーゼにより置換するために（すなわち、ＲＶ５１２２；図３）、ｐＢｇｄＵＳ１を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．８ｋｂのＡａｔＩＩ－ＳｓｔＩ断片（塩基１９０８８４～１９２６４８、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＩＲＳ１およびＵＳ１　Ｃ－末端配列を含む）、ＨＳＶ－１　ｇＨプロモーター（ＭｃＫｎｉｇｈｔ、１９８０）を含む１８０－ｂのＳｍａＩ－ＨａｅＩＩＩ断片、β－グルクロニダーゼ、２５５－ｂのＵＳ１０ポリアデニル化シグナル断片、ならびに１．６－ｋｂのＳｐｈＩ－ＳｐｈＩ断片（塩基１９２９３４～１９４５４４、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＵＳ２およびＣ－末端ＵＳ３配列を含む）を含んでいた。
ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＩＲＳ１をβ－グルクロニダーゼにより置換するために（すなわち、ＲＶ４６；図３）、ｐＢｇｄＩＲＳ１を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．７－ｋｂのＮｃｏＩ－ＮｃｏＩ断片（塩基１８８０６２～１８９７６３、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＩＲＬ１、Ｊ１Ｉ、およびＩＲＳ１プロモーター配列を含む）、β－グルクロニダーゼ、ＵＳ１０ポリアデニル化シグナル（ｐＨｉｎｄ－Ｘからの塩基１９９２７６～１９９０２１）を含む２２５－ｂ断片、ならびに１．２－ｋｂのＮａｒＩ－ＸｈｏＩ断片（塩基１９１８３０～１９３００３、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＣ－末端ＩＲＳ１およびＵＳ１配列を含む）を含んでいた。ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＵＳ１１～ＵＳ２をレポーター遺伝子の挿入なしに欠失させるために（すなわち、ＲＶ７９９；図３）、ｐｄＵＳ１１／ＵＳ２を構築した。順に述べると、このプラスミドは１．８ｋｂのＰｓｔＩ－ＸｂａＩ断片（塩基２０２２０７～２００３９１、ｐＸｂａ－ＰからのＵＳ１３、ＵＳ１２、およびＵＳ１１プロモーター配列を含む）、β－グルクロニダーゼ、ＵＳ１０ポリアデニル化シグナルを含む６５－ｂのＮｒｕＩ－ＡｐａＩ断片（ｐＨｉｎｄ－Ｘからの塩基１９９０８６～１９９０２１）、ならびに１．３－ｋｂのＮｈｅＩ－ＡｐａＩ断片（塩基１９３３６０～１９２０３３、ｐＨｉｎｄ－ＧからのＣ－末端ＵＳ２およびＩＲＳ１配列を含む）を含んでいた。

組換え突然変異体ＨＣＭＶの単離

組換え突然変異体ＨＣＭＶの製造および単離は既に記載された要領で実施された（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１；Ｊｏｎｅｓ　ａｎｄ　Ｍｕｚｉｔｈｒａｓ、１９９２）。ＨＦＦ細胞を、トランスフェクション当日には７０～８０％の密集状態になるように分配した。その細胞をトリプシン処理にかけ、そしてＤＭＥＭ／１０％　ＦＣＳ／２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ中、ｍｌ当たり５．６×10^6細胞に懸濁させた。このＤＮＡを、改変させたリン酸ナトリウム共沈殿技術を用いてトランスフェクトさせた。１．５μｇの感染性ＨＣＭＶ　ＤＮＡおよび２．５μｇＨの直線化させたプラスミドＤＮＡを塩化カルシウム溶液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．０／２５０ｍＭ　塩化カルシウムを含む３００μｌ）中に混合し、そして氷上で冷却させた。共沈殿を開始させるためにはＤＮＡを氷から取り出し、そして３００μｌ　２×　ＨｅＢＳ　ｐＨ６．９５（室温；１×ＨｅＢＳは、１９．２ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＫＣｌ、０．８ｍＭリン酸ナトリウム、０．１％　デキストローズ）を緩和に混合しながら滴下により添加した。１．５分後にはこの沈殿物を氷上に置いた（更に沈殿が形成されるのを防ぐため）。この沈殿を３×10^6の細胞（懸濁物中）と混合し、そして８２ｍｍの組織培養物用プレートに入れた。３７℃で６時間置いた後に、培地を除去し、そして細胞を１×　ＨｅＢＳ中の２０％ＤＭＳＯによるショック状態に２分間さらした。この細胞をＰＢＳで２度洗浄し、そして

増殖用培地を添加した。この培地を４～７日毎に交換した。１４日後にはウイルスプラークが観察され、そしてこの細胞に、１５０μｇ／ｍｌのＸ－ｇｌｕｃ（５－ブロモ－４－クロロ－３－インドール－１－グルクロニド；Ｂｉｏｓｙｎｔｈ社）を含むＤＭＥＭ中の０．５％アガロースを重層した。ブループラーク（すなわち、β－グルクロニダーゼ－陽性突然変異体ウイルスプラーク）を重層物の添加後数日目に取り出した。組換えウイルスを３回プラーク精製した。ＨＣＭＶ突然変異体ＲＶ７９９はβ－グルクロニダーゼ－陰性であり、そして先の方法の改変法を用いて単離された。この場合、β－グルクロニダーゼ－陽性ＨＣＭＶ突然変異体ＲＶ１３４が親ウイルスであった（Ｊｏｈｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１）。従って、トランスフェクションの際には野生型ＡＤ１６９　ＤＮＡの代わりにＲＶ１３４ゲノムＤＮＡが用いられた。初期トランスフェクションプレート上に出現する初期プラークを無作為に取り出し、そしてＨＦＦ細胞上で再度プレート培養させた。１０日後には培地を除去し、そしてその感染細胞に、先に記載されるＸ－ｇｌｕｃ含有性アガロースを重層した。この場合、白色プラーク（β－グルクロニダーゼ－陰性突然変異体ウイルスプラーク）を４日後に取り出し、そしてプラーク精製した。各ＨＣＭＶ突然変異体の適切なゲノム構成を、先に記載されるＤＮＡブロットハイブリダイゼーション分析により確認した（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１）。

抗体

ＨＣＭＶ　ＵＳ１１蛋白質およびＨＣＭＶ　ＵＬ８０蛋白質との反応性を示すウサギポリクローナル抗血清は既に記載されている（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１；１９９４）。ヒトＭＨＣクラスＩ蛋白質の重鎖上のコンホメーション－依存的エピトープに特異的なマウスモノクローナル抗体Ｗ６／３２、およびヒトトランスフェリンレセプターに特異的なＢｅｒ－Ｔ９は購入した。ヒトＭＨＣクラスＩ蛋白質の重鎖上のコンホメーション－非依存的エピトープに特異的なマウスモノクローナル抗体ＴＰ２５．９９（Ｄ’Ｕｒｓｏ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１）はＳ．Ｆｅｒｒｏｎｅ博士（Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｏｌｌｅｇｅ、Ｖａｌｈａｌｌａ、ＮＹ）から取得された。ＨＣＭＶ　ＩＥ１蛋白質に特異的なマウスモノクローナル抗体９２２１はＤｕｐｏｎｔ社から購入した。

感染細胞蛋白質の放射性ラベル化および免疫沈降

パルス－チェイス放射性ラベル化は標準的プロトコール（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９）に従って実施された。ＨＣＭＶで感染させたＨＦＦ細胞（５の感染多重度）を、感染後の表示される時期に、メチオニン／システイン非含有性ダルベッコー改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　ｍｅｄｉｕｍ）（ＤＭＥＭ）中、ｍｌ当たり２００μＣｉの［^{35}Ｓ］メチオニンおよび［^{35}Ｓ］システイン（ＮＥＮ－ＤｕＰｏｎｔ社）でパルス－ラベル化した。この放射活性培地を除去し、そして細胞を２度、完全ＤＭＥＭ中で選択し、そして完全ＤＭＥＭ中、指示される期間のチェイスを実施した。蛋白質は三重洗剤溶解用緩衝液（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９）を用いて抽出した。清澄化させた蛋白質抽出物（１５０００×ｇおよび４℃での５分間の遠心分離の後の上清）を、標準的プロトコール（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９）に従う免疫沈降用に確保した。抗体に結合する蛋白質をプロテインＡセファロース（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社）を用いてペレット化させた。ヒトトランスフェリンレセプターの免疫沈降化のためには、ウサギ抗－マウスＩｇＧ（Ｐｉｅｒｃｅ社）を添加してからプロテインＡセファロースにかけた。洗浄し出した免疫沈降物を２－メルカプトエタノールの存在下で沸騰させ、そして変性用ポリアクリルアミドゲル中での電気泳動にかけた。このゲルを固定化させ、そして１Ｍ　サリチル酸ナトリウム発色剤中に浸し（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９）、その後に乾燥させ、そしてオートラジオグラフィーにかけた。

免疫蛍光法

免疫蛍光アッセイは標準的プロトコール（Ｈａｒｌｏｗ、１９８９）に従って実施された。全手順は６０ｍｍの組織培養用プレート内で実施された。簡潔に述べると、感染させたもしくは感染させていないＨＦＦ細胞を４％パラホルムアルデヒドで固定化させ、そして

０．２％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００での透過性処理を施した（指示される場合）。リン酸緩衝食塩水中の３％　ウシ血清アルブミンの添加後、細胞を一晩４℃下に放置した。この細胞を以下に記載の抗血清で連続的に各々３０分間、室温で処理した：１０％　ＨＣＭＶ－陰性ヒト血清（いずれかのＦｃレセプターを遮断するため）；指示される一次抗体；および、ＦＩＴＣ－複合化抗－マウスもしくは抗－ウサギＩｇＧ（適時）。

実施例２

ＨＣＭＶ野生型に感染させたヒト繊維芽細胞でのクラスＩのダウンレギュレーション

我々は、本発明のヒト包皮繊維芽細胞（ＨＦＦ）細胞培養物系におけるＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションのタイミングおよび性質を確認しようとした。コンホメーション－依存的クラスＩモノクローナル抗体Ｗ６／３２を用いるフローサイトメトリーによると、ＨＣＭＶ株ＡＤ１６９野生型で感染させたＨＦＦ細胞は、感染後後期（すなわち７２時間目）に、それらの細胞表面でのクラスＩ重鎖の発現が有意に減少した（図１）。コンホメーション－非依存的クラスＩモノクローナル抗体（ＴＰ２５．９９）を用いるウエスタン（Ｗｅｓｔｅｒｎ）分析では、安定状態レベルのクラスＩ蛋白質も感染後後期には減少することが示された（図２Ａ）。ウイルスペプチドは感染後に会合するクラスＩ複合体により細胞表面に提示されるため、我々は代謝的に放射ラベル化させた蛋白質の免疫沈降により感染後の様々な時期に合成されるクラスＩ蛋白質の状況を評価しようとした。図２Ｂに示されるように、クラスＩ重鎖の発現の減少は、ウイルスＤＮＡ合成インヒビターであるホスホノフォルメートの存在下および非存在下の両方において検出された。このことにより、ウイルス性の即時初期もしくは初期の遺伝子機能は重鎖減少に十分なものであることが示された。それに加え、重鎖のダウンレギュレーションは感染後の非常に初期の期間：3時間目、に検出されたことが示された（図２Ｃ）。この効果はコンホメーション－非依存的抗体を用いて観察されたため、この減少は新規に合成された重鎖の総体的レベルを反映する。

ＭＨＣクラスＩダウンレギュレーションの喪失についてのＨＣＭＶ突然変異体のスクリーニング

１８の非必須ＯＲＦ（ＵＬ３３、ＵＬ８１、ＩＲＳ１、ＵＳ１～ＵＳ１３、ＵＳ２７～ＵＳ２８、およびＴＲＳ１）を提示する、以前に構築された数々のＨＣＭＶ欠失突然変異体を、フローサイトメトリーおよび免疫沈降分析により重鎖の発現についてスクリーニングした。ＲＶ６７０はＨＣＭＶゲノム（Ｊｏｎｅｓ　ａｎｄ　Ｍｕｚｉｔｈｒａｓ、１９９２）の内のＳ構成部分内に９－ｋｂの領域の欠失を有する突然変異体であり、このＲＶ６７０のみが野生型ダウンレギュレーション表現型を保持していなかった（図４Ａ）。この突然変異体は、糖蛋白質をコードすると仮定されているＵＳ６ファミリーの遺伝子（ＵＳ６～ＵＳ１１）を含む少なくとも１１のＯＲＦ、すなわちＩＲＳ１～ＵＳ１１（ＵＳ１０を除く）を欠失していた（Ｃｈｅｅ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０）。この所見を確認するために、ＲＶ６７０と同一の欠失を有する２つの追加的な独立に取得された突然変異体およびＩＲＳ１～ＵＳ１１の全領域を欠失する新規の突然変異体ＲＶ７１８６（図３）を検査した。各突然変異体は表現型に関してはＲＶ６７０と同一であり、かつクラスＩ重鎖を安定に発現した。我々は予めＵＳ６ファミリーのＯＲＦを欠失する（個々にもしくは群として）ＨＣＭＶ突然変異体（Ｊｏｎｅｓ　ａｎｄ　Ｍｕｚｉｔｈｒａｓ、１９９２）、ならびに近接するＩＲＳ１～ＵＳ３領域内の類似欠失突然変異体を構築した。コンホメーション－非依存的抗体を用いる免疫沈降により、これら全ての突然変異体はクラスＩ重鎖をＨＦＦ細胞内では感染後の後期にダウンレギュレーションする能力を維持することが示された（図４Ａ）。対照実験により、放射性ラベル化は異なる感染細胞間では等価であること（図４Ｂ）、およびｐｐ６５（図４Ｂ）およびＵＬ８０蛋白質（図４Ｃ）の発現により判定したところ感染は後期まで同等に進行したことが示された。これらのデータにより：（１）一つを上回るウイルス遺伝子がクラスＩ重鎖の減少にとっては十分なものであるか；あるいは（ｉｉ）ＲＶ６７０およびＲＶ７１８６において欠失しているが、他の突然変異体では欠失を生じていないＵＳ３とＵＳ６との間の遺伝子（一つもしくは複数）がその表現型には必要とされる、ということが示される。

ＭＨＣクラスＩのダウンレギュレーションにとって必要とされるＨＣＭＶゲノムの７ｋｂ領域の同定

ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションに関わる遺伝子（一つもしくは複数）を含む領域の位置を更に詳しく決定するためには、ＩＲＳ１～ＵＳ１１遺伝子領域内に多重遺伝子の欠失を含む追加的ＨＣＭＶ置換突然変異体を作製した（図３）。これらの突然変異体の内の一つであるＲＶ７９８はＵＳ２～ＵＳ１１の遺伝子を欠失していた。ＲＶ７９８により感染させ、かつ感染後後期に分析したＨＦＦ細胞では、野生型株ＡＤ１６９で感染させた細胞におけるのと同様にＭＨＣクラスＩ重鎖はダウンレギュレーションを受けず（図４Ａ）；事実、ほとんど刺激化は観察されない。ＲＶ７９８と同一の幾つかの独立に取得された欠失突然変異体を類似様式で調査したところ：それら全てはクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションを行う能力を喪失していた。７－ｋｂのＨＣＭＶ　ＵＳ２～ＵＳ１１領域が重鎖のダウンレギュレーションにとって必要とされる遺伝子（一つもしくは複数）を含むということを更に確認するために、ＲＶ７９８と同一のＵＳ２～ＵＳ１１欠失を有するが異なる手法により作製された突然変異体ＲＶ７９９を構築した。ＲＶ７９８は、ＵＳ２～ＵＳ１１の位置にβ－グルクロニダーゼマーカー遺伝子を挿入することにより野生型株ＡＤ１６９から取得された。それとは対照的に、ＲＶ７９９の親はＲＶ１３４であり、これはβ－グルクロニダーゼ陽性の突然変異体であるが、それはその突然変異体がＵＳ９～ＵＳ１０遺伝子間領域内に挿入されたβ－グルクロニダーゼ発現カセットを有するためであった（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１）。ＲＶ７９９を作製するためには、ＲＶ１３４ゲノムでの組換えの際にＵＳ２～ＵＳ１１とβ－グルクロニダーゼ発現カセットの欠失を同時に生じるであろうプラスミドを設計した（図３）。適切なＲＶ７９９　ＨＣＭＶ突然変異体がβ－グルクロニダーゼ基質の存在下では白色プラークとして単離されたが、それはその突然変異体がβ－グルクロニダーゼ陰性であるためであった。ＲＶ７９９は表現型の点ではＲＶ７９８と同一であったが、ＲＶ１３４親株はそうではなかった（図５）。従って、ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションを行う能力を保持する親株を用いる異なる手法によりＲＶ７９８およびＲＶ７９９が作製されたため、このことにより、その表現型にとって必要とされる遺伝子（一つもしくは複数）が７－ｋｂ　ＵＳ２～ＵＳ１１領域内に存在することが確認される（塩基１９３１１９－２００３６０）。

クラスＩ重鎖の適切な表面発現がＲＶ７９８もしくはＲＶ７９９のいずれかに関し、感染後後期に生じるかどうかを決定するために、免疫蛍光アッセイを実施した。コンホメーション－依存的（Ｗ６／３２）もしくはコンホメーション－非依存的（ＴＰ２５．９９）のいずれかのモノクローナル抗体を用いると、ＭＨＣクラスＩ重鎖の表面発現は、感染させていないＨＦＦ細胞、ならびにＲＶ７９８で感染させたＨＦＦ細胞およびＲＶ７９９で感染させたＨＦＦ細胞において検出されたが、野生型ＡＤ１６９で感染させたＨＦＦ細胞においては検出されなかった。感染させていない細胞におけるクラスＩ重鎖の適切な成熟によりエンドグリコシダーゼＨ耐性分子が取得された。それとは対照的に、ＡＤ１６９で感染させた細胞内で合成されたクラスＩ重鎖は全てエンドグリコシダーゼＨ陽性であると報告された（Ｂｅｅｒｓｍａ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３）。図６に示されるように、ＲＶ７９８で感染させたＨＦＦ細胞内で合成されたクラスＩ重鎖は（感染後初期もしくは後期のいずれかでのもの）、感染させていない細胞内で合成されたものに類似の割合で成熟したエンドグリコシダーゼＨ－耐性形態に転化された。まとめてみると、これらのデータにより、ＭＨＣクラスＩ合成、プロセシング、および表面発現はこれらのＨＣＭＶ突然変異体で感染させた細胞内では損なわれてはいないことが示される。更にこの結果により、ＵＳ２～ＵＳ１１の遺伝子を含む７－ｋｂ領域が、ＨＣＭＶによる重鎖のダウンレギュレーションにとって必要とされる一つもしくは複数の遺伝子を含むことが示される。

クラスＩ重鎖のダウンレギュレーションに関わる遺伝子を含む、ＵＳ２～ＵＳ１１遺伝子領域内の２つの小領域

欠失されるＨＣＭＶゲノムの領域はＲＶ３５ではＵＳ６～ＵＳ１１であり、そしてＲＶ７９８ではＵＳ２～ＵＳ１１であった（図３）。ＲＶ３５で感染させたＨＦＦ細胞では、ＭＨＣクラスＩ重鎖はダウンレギュレーションを受けたが、ＲＶ７９８で感染させた細胞で

はそうではなかった（図４Ａ）。このデータにより、重鎖のダウンレギュレーションに関わる一つもしくは複数の遺伝子が、ＯＲＦ　ＵＳ２～ＵＳ５の２－ｋｂの小領域内（小領域Ａ；塩基１９３１１９－１９５６０７）内にマップされることが示される。この２－ｋｂ小領域がクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションにとって必要とされるかどうかを決定するために、ＨＣＭＶ置換突然変異体ＲＶ７１８１およびＲＶ７１７７を調査した。これらの突然変異体内では各々ＨＣＭＶ　ＯＲＦ　ＩＲＳ１～ＩＲＳ９およびＩＲＳ１～ＵＳ６が欠失しており；そのため小領域Ａは両突然変異体から消失している。感染ＨＦＦ細胞における感染後後期での実験により、両突然変異体はクラスＩ重鎖遺伝子発現のダウンレギュレーションを効率よく行う能力を保持することが示された（図７）。従って、ＨＣＭＶゲノム内に存在する場合には小領域Ａ内の遺伝子（一つもしくは複数）はＭＨＣ発現の減少にとって十分なものであるが（例えば、ＲＶ３５）、それらの存在はその表現型にとっては必要とはされない。それに加え、この累積データにより、感染させたＨＦＦ細胞内での効率のよい重鎖のダウンレギュレーションにとって絶対に必要とされるＨＣＭＶ遺伝子は、同定された７－ｋｂのＵＳ２～ＵＳ１１領域（すなわち、ＲＶ７９８内で欠失している領域）内には全く存在しないことが示され、このことによりＵＳ２～ＵＳ１１遺伝子領域内のもう一つの部分からの遺伝子（一つもしくは複数）もやはり、感染後後期の表現型には十分なものであることが示唆される。

ＵＳ１１遺伝子産物がＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションに関わることを示す証拠

ＩＲＳ１～ＵＳ９を欠失する突然変異体ＲＶ７１８１で感染させたＨＦＦ細胞では（図３）、ＭＨＣクラスＩ重鎖発現は、ＲＶ７９８で感染させたＨＦＦ細胞とは対照的にダウンレギュレーションを受けた（図７）。このデータにより、ＵＳ１０とＵＳ１１の遺伝子（塩基１９９０８３－２００３６０）を含んでなる第二小領域（小領域Ｂ）が重鎖発現の減少に関わることが示唆される。しかしながらＨＣＭＶゲノムの状況からのＵＳ１０の発現は重鎖のダウンレギュレーションにとって十分なものではない。ＨＣＭＶ突然変異体ＲＶ６７０は野生型に類似する安定状態レベルでＵＳ１０を発現し、かつ７－ｋｂのＵＳ２～ＵＳ１１遺伝子領域内の他のＯＲＦの全てを欠失していたが、この突然変異体は感染させたＨＦＦ細胞内ではＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションを生じなかった（図２Ｂおよび４Ａ）。

ＵＳ１１は、Ｏ－連結されているのではなくＮ－連結されている炭化水素（これはエンドグリコシダーゼＨに対する完全な感受性を示す）を含む３２－ｋＤａの糖蛋白質（ｇｐＵＳ１１）をコードし、このことによりこの糖は高マンノース形態をとることが示される。ｇｐＵＳ１１は感染期間中を通しずっと、感染後の非常に初期の時期（すなわち３時間目）から始まり、かつ感染後後期にまで継続して検出された。しかしながら感染細胞中のｇｐＵＳ１１のレベルは感染後約８時間目に最も量が多くなる。感染細胞におけるその存在位置を決定するために、ウサギポリクローナル抗血清（Ｊｏｎｅｓ　ａｎｄ　Ｍｕｚｉｔｈｒａｓ、１９９１）を野生型株ＡＤ１６９で感染させた細胞の免疫蛍光アッセイに用いた。感染させていないＨＦＦ細胞およびＲＶ６９９で感染させたＨＦＦ細胞を陰性対照として用いた。ＲＶ６９９は、ＵＳ１１　ＯＲＦの欠失を除いてはＡＤ１６９とアイソジェニックなＨＣＭＶ突然変異体である（Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１）。感染後８時間目に固定化および透過処理を施した細胞では、核の輪郭の鮮明度が不明瞭になった細胞質蛍光がＡＤ１６９で感染させたＨＦＦ細胞には観察されたが、いずれの陰性対照細胞にもそれは観察されなかった（図８）。一般的には特異的蛍光は核周囲の領域で一層強い強度を示した。透過性処理を施していない細胞には特異的蛍光は全く観察されなかった（図８）。この蛍光およびエンドグリコシダーゼＨ感受性データにより、ｇｐＵＳ１１は細胞表面糖蛋白質でないことが示される。翻訳されたＤＮＡ配列から、ｇｐＵＳ１１がそのＮ－およびＣ－末端付近に疎水性ドメインを有することが予想され（Ｗｅｓｔｏｎ　ａｎｄ　Ｂａｒｒｅｌｌ、１９８６）、これらは各々仮想的シグナル配列および貫膜ドメインである。従ってｇｐＵＳ１１は細胞質内膜、恐らくは小胞体と会合する。

ＨＣＭＶ突然変異体による感染後初期のＭＨＣクラスＩ発現のダウンレギュレーション

野生型株ＡＤ１６９で感染させた細胞におけるＭＨＣクラスＩ発現は感染後非常に初期に開始されることが示される（図２Ｃ）。これらの突然変異体の内のいずれかのものがこの初期ダウンレギュレーションについて欠損を有するかどうかについてを決定するために、免疫沈降実験を、感染後６～１０時間目に放射ラベル化させた感染ＨＦＦ細胞からの抽出物を用いて実施した。ＨＦＦ細胞ではクラスＩ重鎖のレベルは、これらの各突然変異体での感染後のこの初期の期間中に減少したが、例外はＲＶ７９８であり、この突然変異体は７－ｋｂのＵＳ２～ＵＳ１１の領域全体の欠損を生じていた（図９Ａ）。対照実験により、様々な突然変異体で感染させた細胞は、同様な状態で感染および放射ラベル化を受けていることが示された（図９ＢおよびＤ）。他の細胞性糖蛋白質トランスフェリンレセプターの発現は、様々な突然変異体によりそれぞれ特異的な影響を受けてはいなかった（図９Ｃ）。従って、感染後初期の重鎖ダウンレギュレーションにとって必要とされる遺伝子は、感染後後期の減少に必要とされるものと同一である。それに加え、感染後後期の重鎖発現のダウンレギュレーションに関わるものと同定されたどちらか一つの小領域からの遺伝子（一りもしくは複数）の発現は、感染後非常に初期の減少にとっては十分なものである。

実施例３

組換えＨＣＭＶ（ＲＶ７９８）ワクチン調製物

ＨＣＭＶワクチンは、既に記載された方法（Ｅｌｅｋ　ａｎｄ　Ｓｔｅｒｎ、１９７４）を用いて調製された。ＨＣＭＶ突然変異体ＲＶ７９８を、ＭＲＣ－５ヒト二倍体肺繊維芽細胞（ＣＣＬ１７１［Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ］）もしくはヒト包皮繊維芽細胞（ＭＲＨＦ［ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ］）上で増殖させた。細胞は、５％ウシ血清および５％ウシ胎仔血清を含むダルベッコー改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　ｍｅｄｉｕｍ）（ＤＭＥＭ）中、１の感染多重度で感染させた。２４時間後、この培地を除去し、そして細胞を３回、ハンクス（Ｈａｎｋ’ｓ）平衡化塩溶液もしくはダルベッコー（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ）リン酸緩衝食塩水のいずれかで洗浄した。無血清の新鮮なＤＭＥＭ培地を添加し；感染細胞を、後期ウイルス性細胞変性効果の出現後４日目にインキュベートした（通常は感染後７日目）。予備清澄化用遠心分離段階（６，０００×ｇ、２０分間、１８℃）の後、無細胞ウイルスを１５，５００×ｇ、１８℃下、１時間の遠心分離によりペレット化させた。ペレット化させたウイルスを、２５％のソルビトールを含むダルベッコー（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ）リン酸緩衝食塩水中に再懸濁させ、そしてアリコートに分けて－７０℃に保存した。ＲＶ７９８ワクチン保存物の力価は、ヒト包皮繊維芽細胞上での標準的プロトコールを用いて決定した（Ｗｅｎｔｗｏｒｋ　ａｎｄ　Ｆｒｅｎｃｈ、１９７０）。このワクチンを、既に記載される要領で約10^3～10^7プラーク形成単位の上腕の三角筋部内への皮下接種により投与する（Ｅｌｅｋ　ａｎｄ　Ｓｔｅｒｎ、１９７４；Ｇｅｈｒｚ　ｅｔ　ａｌ．、１９８０；Ｓｔａｒｒ　ｅｔ　ａｌ．、１９８１）。

実施例４

ＭＨＣクラスＩ重鎖のダウンレギュレーションに十分なｇｐＵＳ１１

ＵＳ１１遺伝子産物がいずれかの他のウイルス遺伝子産物の非存在下で重鎖のダウンレギュレーションを生じることが可能であるかどうかを決定するために、ＵＳ１１コーディング領域（塩基２００３６０－１９９７１６［Ｃｈｅｅ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０］）および塩基２００３９１－１９９６８３を含む幾つかの非コーディングフランク配列を、真核生物発現プラスミド内の構成性ＨＣＭＶ主要即時初期プロモーターエンハンサーの転写制御下にクローン化させた。ヒトＵ３７３－ＭＧ神経膠星状細胞腫細胞（ＨＴＢ　１７［Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ］）をこのプラスミドでトランスフェクトさせ（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９）、そして安定にトランスフェクトされた細胞を０．３７５μｇ／ｍｌのピューロマイシンの存在下で選択したが、それはそのプラスミドも原核生物ピューロマイシン耐性遺伝子をコードするためである。クローンを拾いあげ、そして細胞株に拡張させた。これらの発現性ｇｐＵＳ１１をウエスタンブロット（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔ）分析により同定したところ；様

々な細胞株は様々な量のＵＳ１１を発現した。これらの細胞株でのＭＨＣクラスＩ重鎖発現を類似様式で分析した。図１１に示されるように、ＵＳ１１の発現はクラスＩ重鎖の発現と逆の相関を示した。これらのデータにより、ＨＣＭＶ　ＵＳ１１の発現は、いずれかの他のウイルス性遺伝子産物の非存在下におけるＭＨＣクラスＩ重鎖発現のダウンレギュレーションにとっては十分なものであることが証明される。

引用文献

1. Alford, C. A., and W. J. Britt. 1990. Cytomegalovirus, p. 1981-2010. In D. M. Knipe and B. N. Fields (ed.), Virology, 2nd ed. Raven press, New York.

2. Anderson, M., S. Paabo, T. Nilsson, and P. A. Peterson. 1985. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. Cell 43:215-222.

3. Beck, S., and B. G. Barrell. 1988. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class I antigens. Nature 331:269-272.

4. Beersma, M. F. C., M. J. E. Bijlmakers, and H. L. Ploegh. 1993. Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. J. Immunol. 151:4455-4464.

5. Browne, H., M. Churcher, and T. Minson. 1992. Construction and characterization of a human cytomegalovirus mutant with the UL18 (class I homolog) gene deleted. J. Virol. 66:6784-6787.

6. Browne, H., G. Smith, S. Beck, and T. Minson. 1990. A complex between the MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus and β2 microglobulin. Nature 347:770-772.

7. Burgert, H. G., and S. Kvist. 1985. An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. Cell 41:987-997.

8. Campbell, A. E., J. S. Slater. 1994. Down-regulation of major histocompatibility complex class I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression. J. Virol. 68:1805-1811.

9. Campbell, A. E., J. S. Slater, V. J. Cavanaugh, and R. M. Stenberg. 1992. An early event in murine cytomegalovirus replication inhibits presentation of cellular antigens to cytotoxic T lymphocytes. J. Virol. 66:3011-3017.

10. Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchinson, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, E. Preddie, S. C. Satchwell, P. Tomlinson, K. Weston, and B. G. Barrell. 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154:125-169.

11. Colberg-Poley, A. M., L. D. Santomenna, P. P. Harlow, P. A. Benfield, and D. J. Tenney. 1992. Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression. J. Virol. 66:95-105.

12. del Val, M., K. Munch, M. Reddehasse, and U. Koszinowski. 1989. Presentation of CMV immediate-early antigen to cytotoxic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. Cell 58:305-315.

13. D'Urso, C.M., Z. Wang, Y. Cao, R. Tatake, R.A. Zeff, and S, Ferrone. 1991. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in β2m gene expression. J. Clin. Invest. 87:284-292.

14. Elek, S. D., and H. Stern. 1974. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. Lancet 1:1-5.

15. Gehrz, R. C., W. R. Christianson, K. M. Linner, K. E. Groth, and H. H. Balfour, Jr. 1980. Cytomegalovirus vaccine: specific humoral and cellular responses in human volunteers. Arch. intern. Med. 140:936-939.

16. Gilbert, M.J., S.R. Riddell, C-R. Li, and P.D. Greenberg. 1993. Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. J. Virol. 67:3461-3469.

17. Gooding, L.R. 1992. Virus proteins that counteract host immune defenses. Cell 71:5-7.

18. Gretch, D. R., and M. F. Stinski. 1990. Transcription of the human cytomegalovirus glycoprotein gene family in the short unique component of the viral genome. Virology 174:522-532.

19. Jones, T.R., and Muzithras, V.P. 1991. Fine mapping of transcripts expressed from the US6 gene family of human cytomegalovirus strain AD169. J. Virol. 65:2024-2036.

20. Jones, T.R., and V.P. Muzithras. 1992. A cluster of dispensable genes within the human cytomegalovirus genome short component: IRS1, US1 through US5, and the US6 family. J. Virol. 66:2541-2546.

21. Jones, T.R., V.P. Muzithras, and Y. Gluzman. 1991. Replacement mutagenesis of the human cytomegalovirus genome: US10 and US11 gene products are nonessential. J. Virol. 65:5860-5872.

22. Jones, T.R., L. Sun, G.A. Bebernitz, V.P. Muzithras, H-J. Kim, S.H. Johnston, and E.Z. Baum. 1994. Proteolytic activity of human cytomegalovirus UL80 protease cleavage site mutants. J. Virol. 68: 3742-3752.

23. Jonjic, S., M. de Val, G.M. Keil, M.J. Reddehasse, and U. Koszinowski. 1988. A nonstructural viral protein expressed by a recombinant vaccinia virus protects against lethal cytomegalovirus infection. J. Virol. 62:1653-1658.

24. Mavromara-Nazos, P., M. Ackerman, and B. Roizman. 1986. Construction and properties of a viable herpes simplex virus 1 lacking coding sequences of the alpha 47 gene. J. Virol 60:807-812.

25. McKnight, S. L. 1980. The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. Nucl. Acids Res. 8:5949-5964.

26. Oram, J. D., R. G. Downing, A. Akrigg, A. A. Dollery, C. J. Duggleby, G. W. G. Wilkinson, and P. J. Greenaway. 1982. Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome. J. Gen. Virol. 59:111-129.

27. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

28. Schwartz, R.H. 1985. T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. Ann. Rev. Immunol. 3:237-261.

29. Starr, S. E., J. P. Glazer, H. M. Friedman, J. D. Farquhar, and S. A. Plotkin. 1981. Specific cellular and humoral immunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. J. Infect. Dis. 143:585-589.

30. Tenney, D.J., and A.M. Colberg-Poley. 1991. Human cytomegalovirus UL36-38 and US3 immediate-early genes: temporally regulated expression of nuclear, cytoplasmic, and polysome-associated transcripts during infection. J. Virol. 65:6724-6734.

31. Tenney, D.J., L.D. Santomenna, K.B. Goudie, and A.M. Colberg-Poley. 1993. The human cytomegalovirus US3 immediate-early protein lacking the putative transmembrane domain regulates gene expression. Nucl. Acids Res. 21:2931-2937.

32. Wentworth, B. B., and French, L. 1979. Plaque assay of cytomegalovirus strains of human origin. Proc. Soc. Exp. Biol., Med. 135:253-258.

33. Weston, K. 1988. An enhancer element in the short unique region of human cytomegalovirus regulates the production of a group of abundant immediate early transcripts. Virology 162:406-416.

34. Weston, K., and B.G. Barrell. 1986. Sequence of the short unique region, short repeats, and parts of the long repeats of human cytomegalovirus. J. Mol. Biol. 192:177-208.

35. Yamashita, Y., K. Shimokata, S. Mizuno, H. Yamaguchi, and Y. Nishiyama. 1993. Down-regulation of the surface expression of class I MHC antigens by human cytomegalovirus. Virology 193:727-736.

36. York, I.A., C. Roop, D.W. Andrews, S.R. Riddell, F.L. Graham,

and D.C. Johnson. 1994. A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. Cell 77:525-535.

37. Zinkernagel, R.M., and P.C. Doherty. 1980. MHC restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity. Adv. Immunol. 27:51-177.

【図１Ａ】

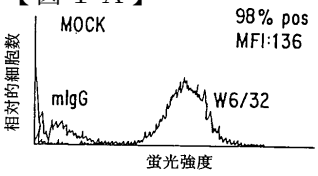


FIG. 1A

【図１Ｂ】

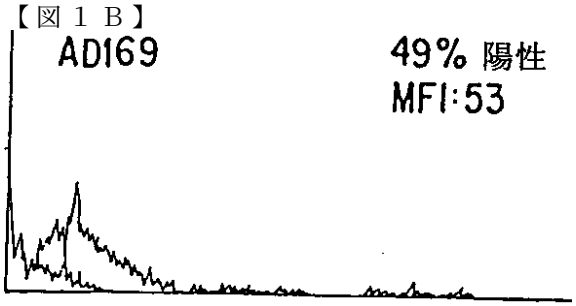


FIG.1B

【図１Ｃ】

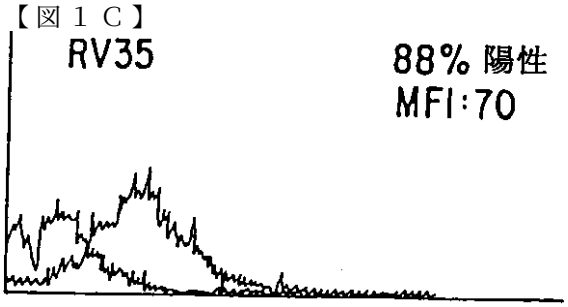


FIG. 1C

【図１Ｄ】

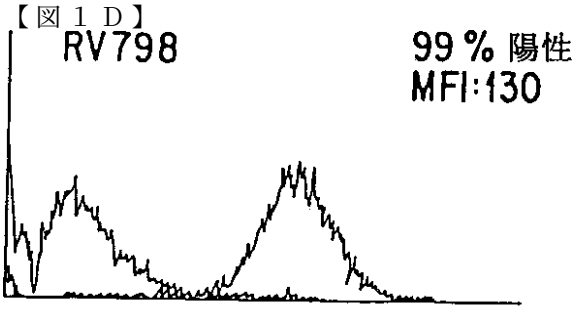


FIG.1D

【図１Ｅ】

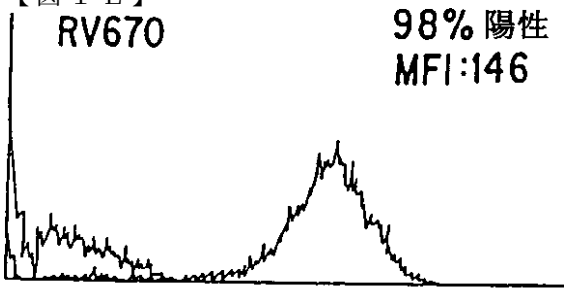


FIG. 1E

【図２Ａ】

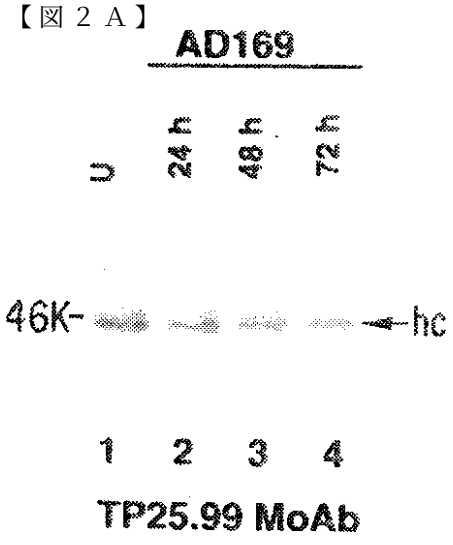


FIG. 2A

【図２Ｂ】

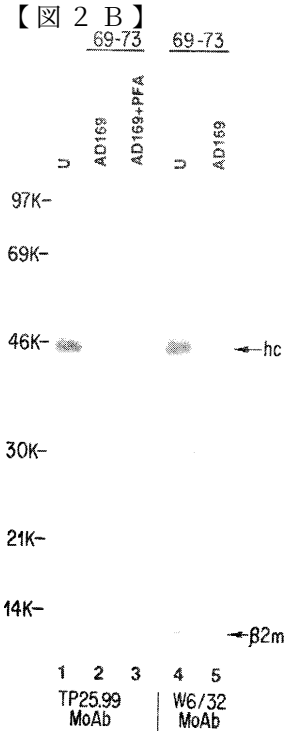


FIG. 2B

【図２Ｃ】

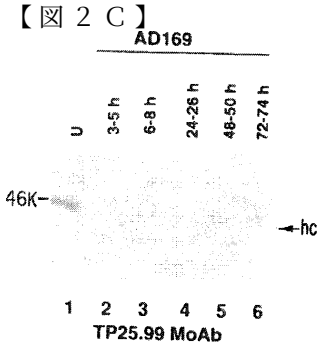


FIG. 2C

【図３Ａ】

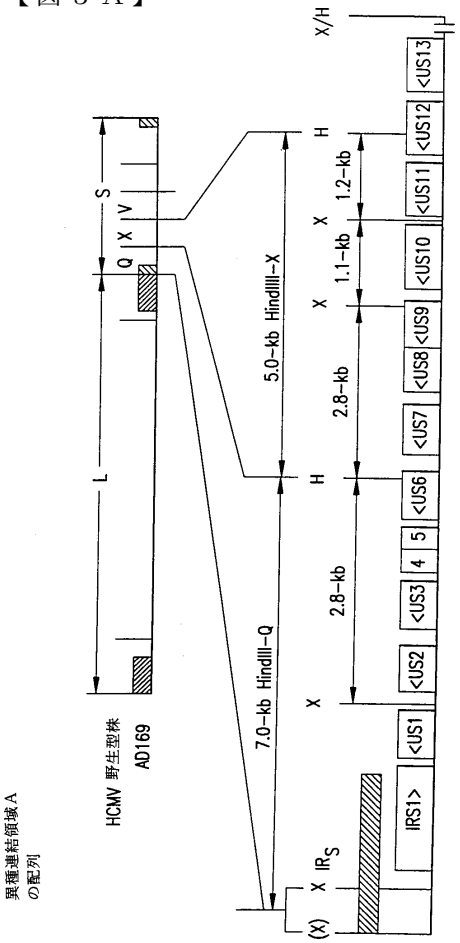


FIG. 3A

【図３Ｂ】

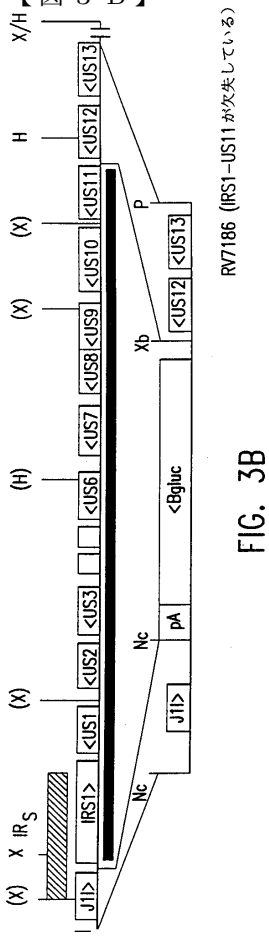


FIG. 3B

【図３Ｃ】

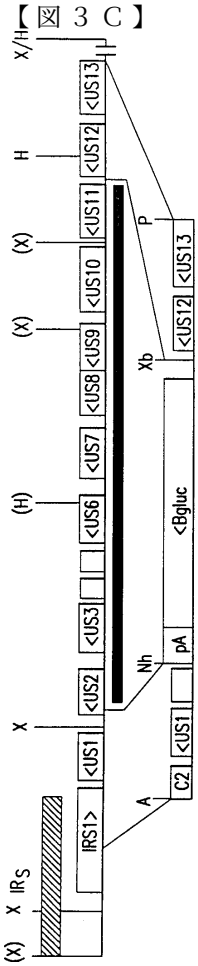


FIG. 3C

【図３Ｄ】

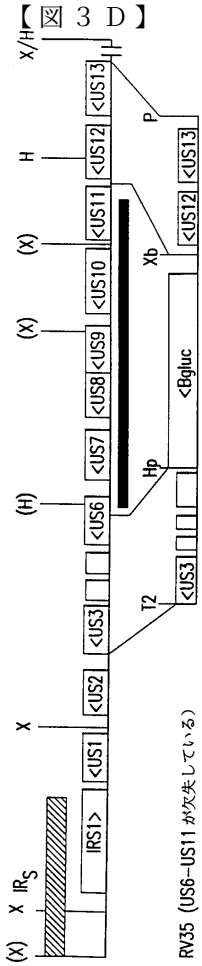


FIG. 3D

【図３Ｅ】

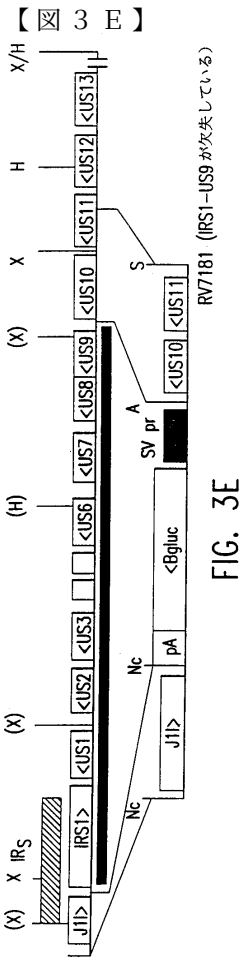


FIG. 3E

【図３Ｆ】

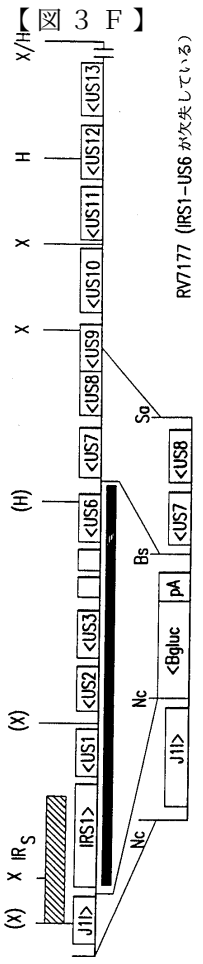


FIG. 3F

【図３Ｇ】

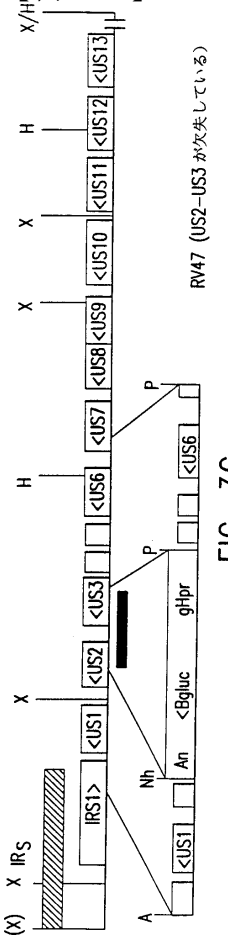


FIG. 3G

【図３Ｈ】

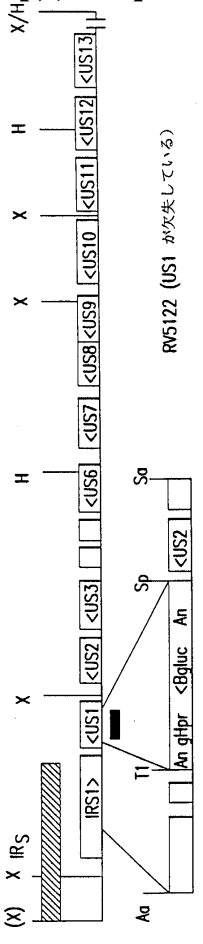


FIG. 3H

【図３Ｉ】

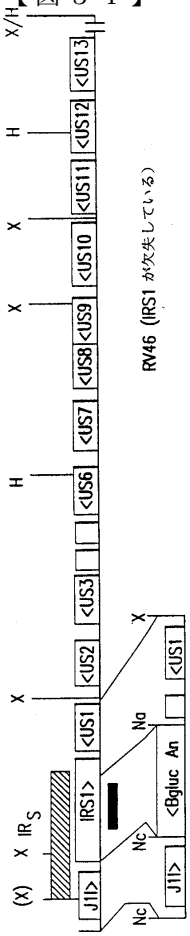


FIG. 3I

【図３Ｊ】

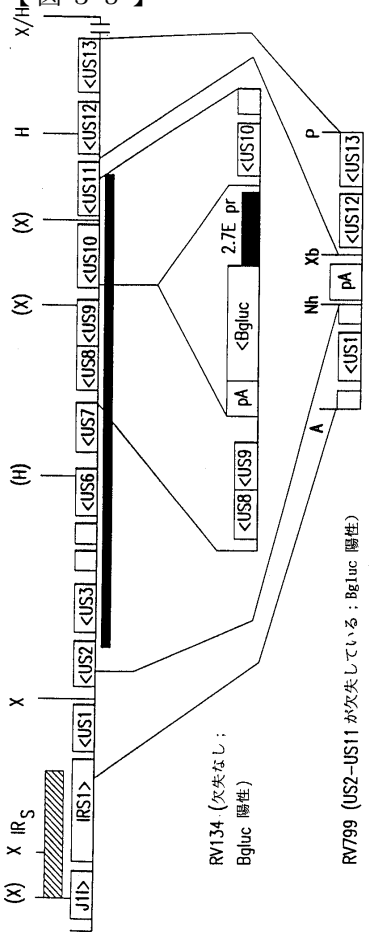


FIG.3J

【図４】

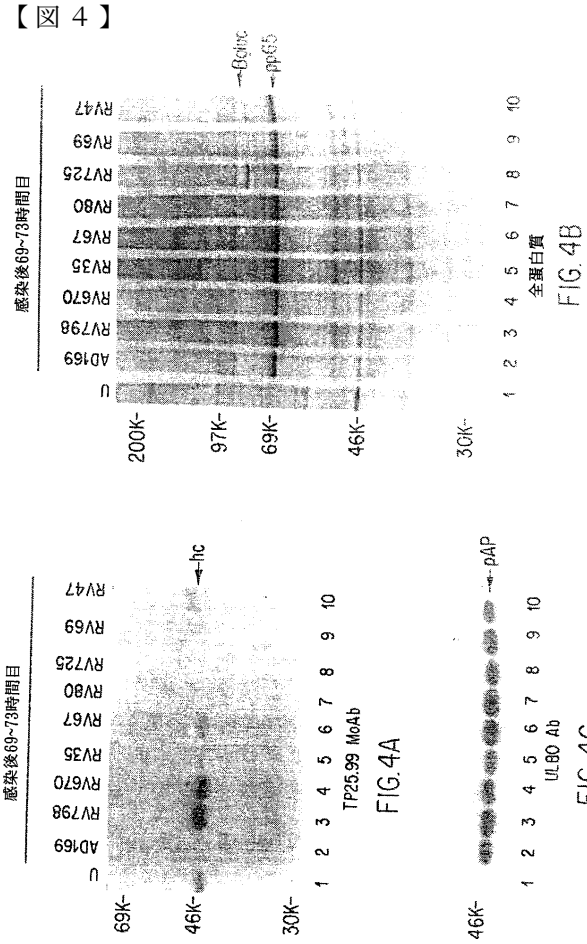


FIG. 4B

FIG. 4A

FIG. 4C

【図５】

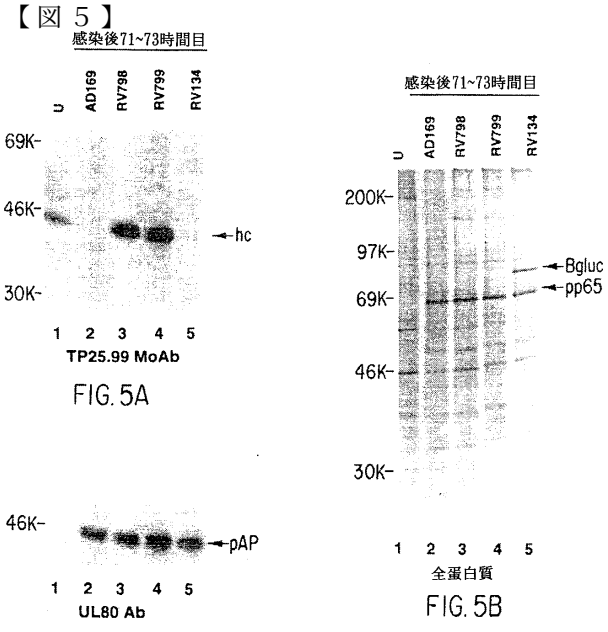


FIG. 5A

FIG. 5C

FIG. 5B

【図６】

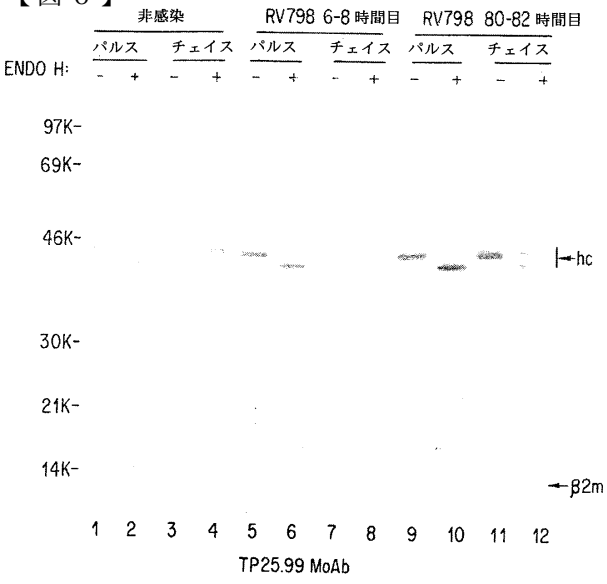


FIG. 6

【図７】

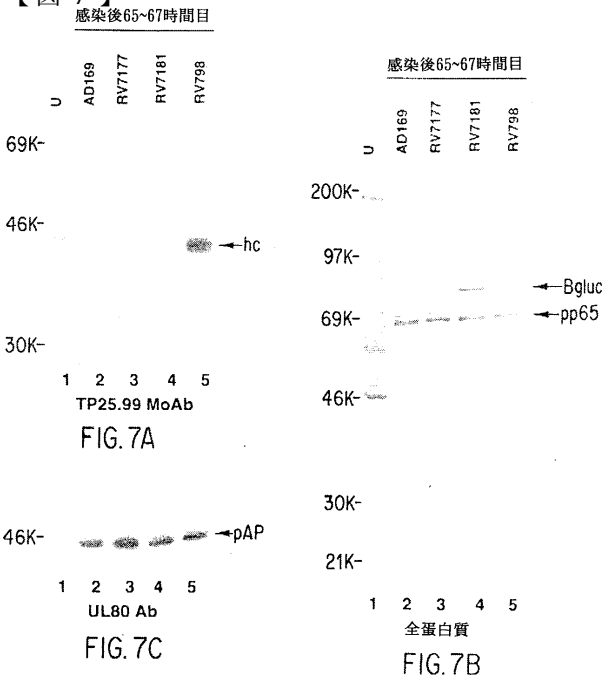
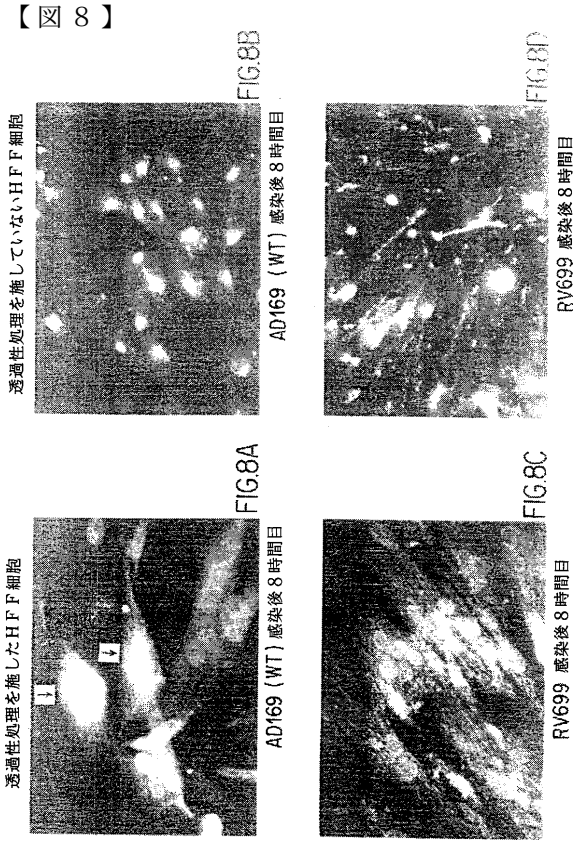


FIG. 7A

FIG. 7C

FIG. 7B

【図８】



【図９】

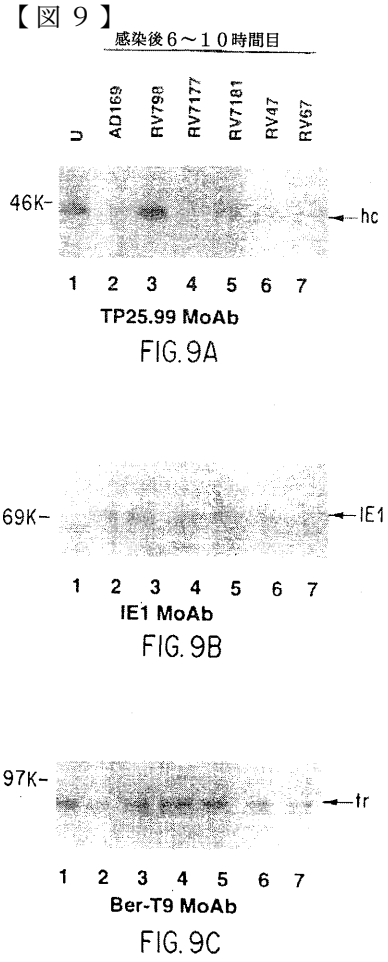


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C

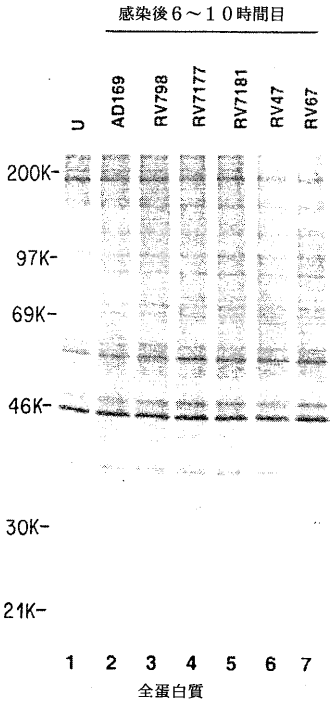


FIG. 9D

【図１０】

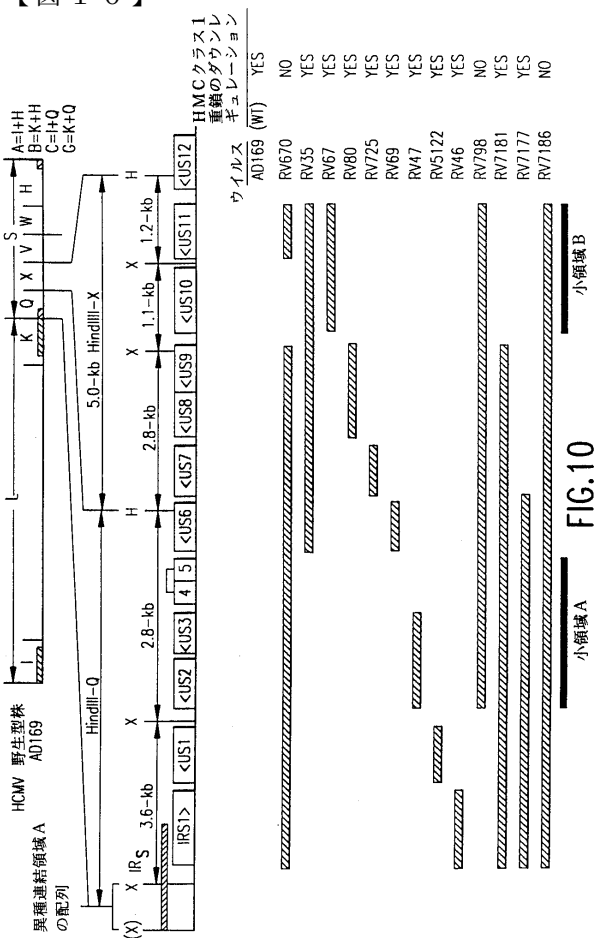


FIG.10

【図１１】

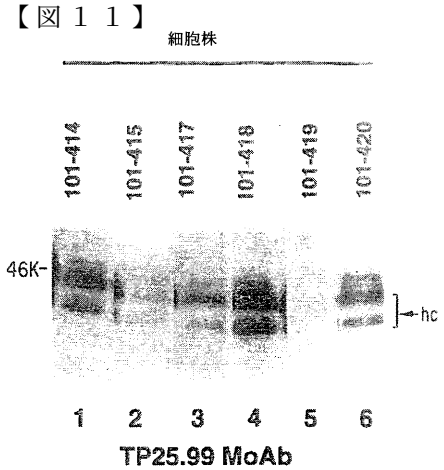


FIG.11A

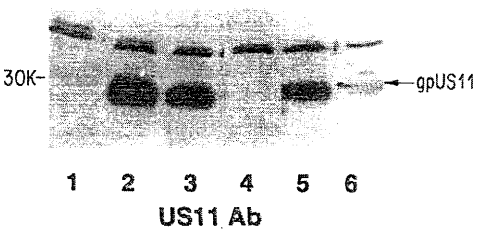


FIG.11B

フロントページの続き

(72)発明者 ジョーンズ, トマス・アール
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０９５６ニューシテイ・フイールドクレストドライブ４
(72)発明者 キヤンベル, アン・イー
アメリカ合衆国バージニア州２３５０７ノーフオーク・コロニアルアベニユー７１０

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特表平０３－５０４１９７（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－０９８７７５（ＪＰ，Ａ）
Curr.Top.Microbiol.Immunol.,Vol.154(1990)p.125-169
J.Virol.,Vol.66,No.4(1992)p.2541-2546
J.Virol.,Vol.65,No.11(1991)p.5860-5872

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00
C12N 7/00 - 7/04
C07K 14/045
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)