

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4191797号

(P4191797)

(45) 発行日 平成20年12月3日(2008.12.3)

(24) 登録日 平成20年9月26日(2008.9.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 B

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 9/12

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

C 1 2 Q 1/48 Z

請求項の数 22 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-513707
 (86) (22) 出願日 平成8年9月27日(1996.9.27)
 (65) 公表番号 特表平11-514862
 (43) 公表日 平成11年12月21日(1999.12.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/015571
 (87) 国際公開番号 W01997/012033
 (87) 国際公開日 平成9年4月3日(1997.4.3)
 審査請求日 平成15年8月28日(2003.8.28)
 (31) 優先権主張番号 60/004,383
 (32) 優先日 平成7年9月27日(1995.9.27)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

エモリー ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 30322 ジョージア
 州 アトランタ リッジウッド ドライブ
 2009

(74) 代理人

弁理士 恩田 博宣

(72) 発明者

ハーゲドーン、カート エイチ.
 アメリカ合衆国 30319 ジョージア
 州 アトランタ クラブ ドライブ 45
 38

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み換えC型肝炎ウイルスRNAレプリカーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のアミノ酸配列：

M A (S) (M) (S) (Y) (S) (W) (T) (G) (A) - [⁹ N S 5 B]

(式中、

括弧内の任意のアミノ酸が選択的に欠失され、括弧内の0～5個の任意のアミノ酸が選択的にアミノ酸と置換され、かつ ⁹ N S 5 B は配列番号2のアミノ酸12～593位のアミノ酸配列である。)

を含む組み換えHCV-RDRP。

【請求項2】

精製された形態の請求項1に記載の組み換えHCV-RDRP。

【請求項3】

括弧内の1～5個のアミノ酸がアラニンにより置換されている、請求項1に記載の組み換えHCV-RDRP。

【請求項4】

括弧内の1～5個のアミノ酸がヒスチジンにより置換されている、請求項1に記載の組み換えHCV-RDRP。

【請求項5】

⁹ N S 5 B が、配列番号2に従う番号で、A r g₅₇₀ H i s、A r g₅₇₂ H i s、又はT r p₅₇₃ H i sの群から選択されるアミノ酸置換を含む、請求項1に記載の組み換

え H C V - R D R P。

【請求項 6】

前記⁹ N S 5 B は、配列番号 1 の 3 4 ~ 1 7 7 9 位の核酸配列によりコードされている、請求項 1 に記載の組み換え H C V - R D R P をコードする発現可能なコード配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の組み換え H C V - R D R P をコードする D N A で形質転換された宿主細胞から可溶性 R D R P 酵素を調製する方法において、前記方法は、酵素適合性バッファ中に非イオン性洗浄剤、プロテアーゼ阻害剤、及び宿主細胞壁加水分解酵素を含む溶解バッファ中で濃縮された宿主細胞を超音波処理する工程と、
超音波処理された細胞を凍結させ解凍して細胞溶解物を作製する工程と、
R D R P 酵素が上清画分に保持されるように 1 0 , 0 0 0 ~ 2 5 , 0 0 0 × g で遠心分離を行うことにより除去され得る粒子を該溶解物から除去する工程と、を含む方法。

10

【請求項 8】

宿主細胞が大腸菌である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

宿主細胞が大腸菌であり、宿主細胞壁加水分解酵素がリゾチームである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 0】

組み換え H C V - R D R P をコードする D N A を含む請求項 1 に記載の活性 H C V - R D R P を発現可能な哺乳動物細胞系。

20

【請求項 1 1】

細胞系が U 9 3 7、h e p G 2、又は P K 1 5 の群より選択される、請求項 1 0 に記載の哺乳動物細胞系。

【請求項 1 2】

組み換え H C V - R D R P が M A [N S 5 B] ([N S 5 B]) は配列番号 2 のアミノ酸 2 ~ 5 9 3 位のアミノ酸配列である)であるアミノ酸配列から構成される、請求項 1 0 に記載の哺乳動物細胞系。

【請求項 1 3】

同一細胞内に活性組み換え H C V - R D R P の存在に依存して翻訳されるレポーター遺伝子をさらに含む、請求項 1 0 に記載の哺乳動物細胞系。

30

【請求項 1 4】

レポーター遺伝子がレポーターをコードする R N A のアンチセンスを含むメッセンジャー R N A を発現する、請求項 1 3 に記載の哺乳動物細胞系。

【請求項 1 5】

H C V - R D R P に対する阻害活性について化合物を試験する方法であって、
請求項 1 に記載の組み換え H C V - R D R P により触媒されるインビトロ R N A 合成反応中の R N A 産物を測定する工程と、
前記化合物の存在下で合成された R N A 量と非存在下で合成された R N A 量とを比較し、
化合物の存在下で合成された R N A 量が減少している場合、化合物が H C V - R D R P に対する阻害活性を有していると判断する工程と、
を含む方法。

40

【請求項 1 6】

被検化合物の存在下及び非存在下での対照酵素の活性を比較し、被検化合物により対照酵素が阻害される場合、組み換え H C V - R D R P に対する特異的効果が存在しないと判断する工程をさらに含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

インビボでの組み換え H C V - R D R P に対する阻害活性について化合物を試験する方法であって、
請求項 1 に記載の組み換え H C V - R D R P をコードする D N A を含む活性組み換え H C

50

V - R D R Pを発現しうる哺乳動物細胞系を調製する工程と、
同一細胞内に活性組み換えH C V - R D R Pの存在に依存して翻訳されるレポーター遺伝子を該細胞系に形質転換し、それにより、レポーター細胞系が調製される工程と、
該レポーター細胞系を被検化合物の存在下又は非存在下でインキュベートして、それにより被検化合物による組み換えH C V - R D R Pの阻害によりレポーター遺伝子の翻訳が阻害される工程と、
を含む方法。

【請求項 1 8】

レポーター遺伝子がガルシフェラーゼ、分泌アルカリフォスファターゼ、又は蛍光グリーンタンパク質の群より選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

10

【請求項 1 9】

レポーター遺伝子が転写されレポーターのアンチセンスをコードするメッセンジャーRNAを生成し、組み換えH C V - R D R Pにより該メッセンジャーRNAに対する相補RNAが合成されることにより、活性レポーターを生じるために翻訳可能なセンスメッセンジャーRNAが生成する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

レポーターの転写されたメッセンジャーRNAが、レポーターアンチセンスコーディング領域の3'側に位置するH C V由来の内部リボソーム侵入部位をさらに含み、組み換えH C V - R D R Pにより該メッセンジャーRNAに対する相補RNAが合成されることにより、センスメッセンジャーRNAコーディング領域の5'側に内部リボソーム侵入部位を有するメッセンジャーRNAが生成し、レポーターのキャップ構造非依存性の翻訳が提供される、請求項 1 8 に記載の方法。

20

【請求項 2 1】

感染患者から取得された血清中のH C V - R D R Pに対する抗体を測定又は検出するための方法であって、

抗原 - 抗体複合体が形成されるように抗体を請求項 1 に記載の組み換えH C V - R D R Pと接触させる工程と、

抗原 - 抗体複合体を未結合の抗体又は前記組み換えH C V - R D R Pから分離する工程と、

抗原 - 抗体複合体を測定又は検出する工程、

30

とを含む方法。

【請求項 2 2】

組み換えH C V - R D R Pをゲル電気泳動により局在化し、ゲルをH C V - R D R Pに対する抗体を含む血清と接触させ、抗原 - 抗体複合体を標識された抗ヒト抗体により検出又は測定する、請求項 2 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本願は、1995年9月27日出願の米国仮出願第60/004,383号に基づく優先権を主張するものである。

発明の分野

本発明は、C型肝炎ウイルス(H C V)に関し、より詳細には、H C VゲノムによりコードされるRNA依存性RNAポリメラーゼ(R D R P)の発現及び精製、H C V - R D R Pに対する抗体、ならびに、慢性H C V感染を診断するため、H C Vに対して有効な抗ウイルス剤をスクリーニングするために、該酵素を使用する方法に関する。

40

発明の背景

H C Vは、輸血後肝炎及び散発性非A非B型肝炎の原因となる主要な作用因である(Alter, H.J. (1990) J. Gastro. Hepatol. 1: 78-94; Dienstag, J.L. (1983) Gastro 85: 439-462)。スクリーニング法が改善されているにもかかわらず、H C Vは依然として、多数の国における急性ウイルス性肝炎の少なくとも25%の原因となっている(Alter, H.J. (1990) 前出; Dienstag, J.L. (1983) 前出, Alter, M.J. et al. (1990a) J.A.M.A. 264: 2231-2235; Alter, M.J. et al (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1899-1905; Alter,

50

M.J. et al. (1990b) N. Engl. J. Med. 321: 1494-1500)。慢性感染した（そして感染性の）保菌者では、HCV感染は潜伏性であることが多く、そのような保菌者では長期にわたり臨床的徴候が見られないことがある。急性感染は慢性感染（70～100%）及び肝臓病（>50%）へと進行する確率が高いこと、世界中に分布していること、そしてワクチンが存在しないことから、HCVは罹病及び死亡の重大な原因となっている。

HCVは、エンベロープに包まれたウイルスであり、そのゲノムは9.4 kbの一本鎖RNA（センス（+））で、単一のポリタンパク質をコードしている。該ポリタンパク質はタンパク分解によりプロセシングされ、少なくとも9種のタンパク質を生じる。HCVはペステイウイルス及びフラビウイルスに関連している（Choo, Q-L. et al. (1989) Science 244: 362-364; Choo, Q-L. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451-2455）。既にHCVに感染したことがあるチンパンジーの再感染により、防御免疫が一時的であるか、又は存在しないことが示唆されている（Farci, P. et al (1992) Science 258: 135-140）。さらに、最近のワクチン試験の結果から、有効なワクチンの開発は期待できないことが示されている（Houghton, M. et al. (1994) 2nd Internat. Meeting on Hepatitis C (San Diego)）。既存の抗ウイルス剤を用いた慢性HCV感染の治療が試みられているが、治癒率は低く、重篤な副作用を生じている（Dienstag, J. L. (1983) 前出）。

HCVゲノムのヌクレオチド配列はクローン化され、単一の読み取り枠が同定されている。ワクシニアウイルス発現系を用いて、いくつかの分解産物が仮同定されている（Lin, C. et al. (1994) J. Virol. 68: 5063-5073; Grakoui, A. et al. (1993) J. Virol. 67: 1385-1395）。コーディング領域の種々のセグメントから推定されたアミノ酸配列より合成された様々なペプチドに対して得られた抗体により、種々の推定分解産物が認識された。抗体反応性のペプチドの大きさがSDS-PAGEにより推定された（図1参照）。5Bと表された非構造タンパク質（NS5B）は、SMSY（Ser-Met-Ser-Tyr）というアミノ末端配列を有することが示されている。NS5B領域は、68 kdのタンパク質（p68）をコードしており、該タンパク質には、他のRNAウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼに見られる内部GDD（Gly-Asp-Asp）モチーフが含まれる（Koonin, E.V. (1991) J. Gen. Virol. 72: 2197-2206）。しかし、HCV p68にはポリメラーゼ活性は検出されていない。実際、5Bタンパク質（p68）単独では活性を有するRNA依存性RNAポリメラーゼ酵素がコードされず、他のサブユニット、おそらくNS5A遺伝子産物が、触媒活性に必須であるという問題が生じている。これまでに、本発明者ら及び他の研究者らは、融合産物の精製を容易に行うことができるような既存の発現系、及び特異的分解を用いて、NS5Bコーディング領域を融合タンパク質として発現させようと試みているが、活性を有するポリメラーゼは得られていない。

発明の概要

本発明は、HCVの修飾されたNS5Bコーディング領域を哺乳動物又は細菌の宿主細胞で発現させることにより得られる、RDRP活性を有するHCVの組み換えタンパク質（r-HCV-RDRP）を提供する。修飾には、アミノ末端にメチオニン残基を付加し、さらに選択的に、N末端メチオニンと未修飾のNS5B遺伝子産物のN末端セリンとの間に1～20個の付随的なアミノ酸を挿入することが含まれる。修飾には、アミノ末端において最大9アミノ酸を欠失させ、アミノ末端メチオニンを提供することも含まれる。野生型HCV-RDRPの推定配列によると、2個のメチオニンが天然に存在する。したがって、修飾には、N末端に存在するアミノ酸をいずれかのメチオニンまで欠失させるか、あるいは、2個のメチオニンの中間点までを欠失させ、かつN末端メチオニンコドンが付加することが含まれる。記載された制限内であれば、欠失及び挿入の組み合わせも、考えられる。特異的なプロテアーゼ分解部位を形成するように、付加されたアミノ酸配列を工夫し、インビボ又はインビトロでの組み換えHCV-RDRP発現産物の翻訳後修飾が可能となるようにすることができる。このような転写後修飾は、N末端セリンを有する、NS5Bによりコードされたアミノ酸配列を、正確に作成するために用いることができる。精製を簡便、かつ容易にするため、アフィニティリガンド結合部位を形成するように、付加

10

20

30

40

50

されたアミノ酸配列を工夫することもできる。本明細書において報告するデータは、野生型のプロセッシングを受けたタンパク質の推定 S M S Y 配列の代わりに、M A S M S Y (配列番号 6) という N 末端配列を与える、N 末端に M A (M e t - A l a) ジペプチドを有する r - H C V - R D R P で得られたものである。したがって、N S 5 B のコーディング配列は、5' 末端にメチオニンコドン (A T G) を含み、さらに選択的に、他のアミノ酸に対するコドンを含むか又は欠失するように修飾される。酵素活性に対して生じうる有害な影響を回避するとともに人工的なエピトープの作出を回避するために、修飾は最少限であることが好ましい。r - H C V - R D R P は、活性 R D R P を得るために大腸菌及び哺乳動物細胞で発現させることができる。大腸菌における活性 r - H C V - R D R P の発現により、ポリメラーゼ活性には、H C V がコードする他のタンパク質は不要であることが示される。

10

本発明はさらに、可溶化された形態の r - H C V - R D R P、及び活性を損なうことなく可溶化する方法を提供する。

本発明はまた、可溶化された形態の H C V - R D R P を精製する方法を提供する。他の方法と組み合わされて使用される、一つの方法としては、アフィニティリガンドとして r - H C V - R D R P に対する抗体を使用したアフィニティクロマトグラフィーがある。他のアフィニティリガンドは、例えば、Wu, J. et al. (1994) Biochemistry 33:14825-14833、及び、Ohlmeyer, M.H.J. et al. (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 10922-10926 に記載されているようなコンビナトリアル・ライブラリー (combinatorial library) 法により得られる。

20

さらに、本発明は、H C V - R D R P に特異的なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を提供する。このような抗体は、精製された酵素を抗原として用い、既知の方法により作製することができる。このような抗体は、r - H C V - R D R P 又は野生型 H C V - R D R P のいずれかに結合する。このような抗体が利用可能になることにより、H C V - R D R P の迅速な精製のためのアフィニティ標識クロマトグラフィー・マトリックスの調製が可能となる。また、抗体により、生物学的物質、例えば H C V 感染患者の血清中の H C V - R D R P を迅速に検出することも可能となる。

本発明はさらに、哺乳動物細胞に H C V - R D R P を形質転換し、細胞内で酵素を発現させる方法を提供する。結果的に、本発明は、r - H C V - R D R P を発現する形質転換された哺乳動物細胞系も提供する。該細胞は、抗ウイルス候補化合物の、R D R P 活性の阻害剤としての効果をアッセイするために有用である。

30

したがって、本発明はまた、インビボで R D R P 活性の阻害剤となりうる化合物をスクリーニングする方法も提供する。ポリメラーゼの阻害によりウイルス複製及びウイルス遺伝子産物の発現が阻害されるため、阻害活性を有する化合物は、抗ウイルス活性を有している可能性がある。感染細胞に侵入することができない化合物を排除することができるため、インビトロアッセイは有用である。注目すべき候補化合物の一つのクラスは、ヌクレオシド類似体である。これは、細胞内で修飾 (リン酸化) された後、酵素の基質部位に結合するか、又は新たに合成された R N A 中に取り込まれ、H C V ポリメラーゼの正常な機能、又は類似体を含む R N A のさらなる複製を阻害する化合物である。アシクロビルは、ウイルスポリメラーゼ (D N A 依存性 D N A ポリメラーゼ) を阻害し、プライマー - 鋳型機能を阻害 (鎖終結) することにより、D N A ウイルスの複製を阻害する、極めて有効かつ安全なヌクレオシド類似体の一例である。このような類似体は、ほとんどの場合、ヌクレオチド三リン酸の形態でのみ有効である。インビトロアッセイでは、化合物をヌクレオシド型又はヌクレオシドリン酸型で投与し、細胞の内在代謝活性によりその型を活性な三リン酸型へと変換させるため、インビボアッセイで必要とされるような三リン酸型の化学合成の工程が不要であるという、便利な方法が提供される。

40

インビトロで H C V - R D R P 活性を測定する方法もまた提供される。このようなアッセイは、酵素の同定、及び精製中の濃度測定を可能にするものである。さらに、該アッセイは、抗ウイルス剤候補として潜在的な R D R P 阻害剤をスクリーニングするための、付随的なインビトロの方法を提供する。

50

原則として、いかなる化合物も、RDRP阻害剤の候補として試験することができる。ある種の化合物クラスが、注目すべき候補と考えられる。これには、ヌクレオシド類似体、オリゴヌクレオチド、及びペプチドが含まれるが、これらに限定されない。平面的な多環芳香族性の特徴を有する化合物も、阻害剤としての可能性を有する。有効なRDRP阻害剤として同定された化合物は、治療薬としての試験を受ける前に、毒性、生物学的利用率、副作用などについてさらにスクリーニングする必要があることが理解されるであろう。しかしながら、HCV-RDRPの阻害剤としての最初の同定は、抗ウイルス治療の開発における重要な第一段階である。r-HCV-RDRPの阻害剤は野生型HCV-RDRPも阻害するということも、認識されるであろう。

本発明の別の態様において、精製されたHCV-RDRP又はr-HCV-RDRPの存在により、HCV感染患者の血清中に存在するRDRP抗体を検出及び測定することが可能となる。このような抗体が少しでも存在するという事実は、それ自体が、本発明による精製r-HCV-RDRPの発現及び調製により可能となる発見である。感染血清中のHCV-RDRPに対する循環する抗体の存在は、感染細胞が溶解し、HCV-RDRPが細胞外液及び血流へと放出され、該細胞外液及び血流にて抗体反応を刺激しうるためであると考えられる。病気の重度が変動するにつれ、放出されるHCV-RDRP量、及びHCV-RDRPに対する抗体の量も変動する。したがって、患者の血清中に存在するHCV-RDRPに対する抗体の量は、感染の存在の指標のみならず、所定の時点における(病気の)重度の指標として使用することもできる。抗HCV-RDRPに対するアッセイは、感染を診断する手段として、そして、経時的な、又は治療に応答した病気の経緯をモニターするための手段として使用され得る。抗HCV-RDRPに対するアッセイは、本明細書に記載されたゲル分離法のような、様々な既知の方法により実施することができる。他の適切な方法には、ELISA及びラジオイムノアッセイが含まれる。抗体を捕捉するための固定化r-HCV-RDRPを用いたサンドイッチ型アッセイでは、酵素、放射性同位元素、蛍光性分子、又は化学発光マーカーなどの適切なマーカーで標識された抗免疫グロブリン試薬が使用され得る。これらはすべて、当業者に理解されるであろう(Antibodies: A laboratory manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) pp. 553-611)。

【図面の簡単な説明】

図1 C型肝炎ウイルスゲノム及びポリタンパク質分解産物。HCVポリタンパク質の分解産物は、ワクシニアウイルス発現系を用いて仮同定されている。この系において発現され、プロセッシングされた5Bタンパク質のアミノ末端は、SMSY(Ser-Met-Ser-Tyr)である。出版されている報告では、5Bタンパク質がRNAポリメラーゼ活性を有していることは示されていないが、他のRNA依存性RNAポリメラーゼに見られるGDD(Gly-Asp-Asp)モチーフが含まれている。5Bタンパク質単独では活性のあるRNA依存性RNAポリメラーゼ酵素がコードされず、他のサブユニット(おそらくNS5A遺伝子産物)が、触媒活性に必須であるという問題が生じていた。本研究の初期においては、本発明者らは、NS5Bによりコードされるタンパク質が単に他の必須因子が欠如していることが原因でRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を示さないのか、確認できていなかった。

図2 T7ポリメラーゼ駆動性Studierベクターを用いた、大腸菌におけるr-HCV RNA依存性RNAポリメラーゼの発現。組み換え技術により作製されたT7ポリメラーゼ駆動性発現ベクターを含む大腸菌を、OD₆₀₀が0.6に達するまで37℃でインキュベートした。細胞サンプルを得、IPTGを最終濃度1mMとなるよう添加した。IPTG誘導から1、2、及び3時間後にサンプルを回収した。完全な細胞を95℃で1×サンプルバッファー中で溶解し、サンプルを10%SDS-PAGEで分析した。写真は、クーマシーブルーで染色した代表的なゲルを示す。レーン1は分子量マーカー、レーン2は未誘導対照(0時間)、レーン3はIPTG誘導から1時間後、レーン4はIPTG誘導から2時間後、レーン5はIPTG誘導から3時間後を示す。組み換えr-HCV RNA依存性RNAポリメラーゼは、矢印(RDRP)で示されている。

図3 数人の慢性C型肝炎患者は、組み換えHCV RNA依存性RNAポリメラーゼと反応する循環抗体を有している。r-HCV RDRPを発現している細胞を収集し、SDS-PAGEサンプルバッファー中で加熱することにより溶解した。可溶性のタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース膜へと転移し、イムネティクス・ミニブロッター・テンプレート (Immunetics Miniblotter template) (Hagedorn, et al. FEBS Lett. (1990) 264: 59-62) を用いてヒト血清でイムノブロッティングを行った。イムノブロットを、二次抗ヒトホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗体、及び増幅化学発光法 (ECL, Amersham) を用いて発色させた。この写真は、イムノブロットを示す。レーン1では正常ヒト血清をプローブとして用い、レーン2 (1:500希釈)、レーン3 (1:300希釈)、及びレーン4 (1:200希釈) では、慢性C型肝炎患者の血清をプローブとして用いた。組み換えHCV RDRPの位置 (クーマシー染色及びボンソーS染色により可視化した) は、矢印で示されている。これらのレーン3及び4に見られる低分子量のバンドは、完全な大腸菌溶解物をイムノブロットで使用した際に見られた、RDRPのタンパク分解断片を示す。

10

図4 非変性条件下でのHCV RDRPの可溶化。標準的な方法を用いて、r-HCV RDRPを発現している細胞を収集し、処理した。不溶性大腸菌ペレット (ペレット、陽性対照)、及びRDRP発現ベクターを含む細胞又は含まない細胞 (陰性対照) からの可溶性画分をSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース膜に転移した。図3に概説されているようにして、ニトロセルロースに結合したタンパク質を、ウサギ免疫前血清及びウサギ抗RDRP血清をプローブとして検出した。ブロットをECL系 (Amersham) を用いて発色させた。写真は、イムノブロットを示す。レーン1、3、5、7、及び9では免疫前血清をプローブとして用い、レーン2、4、6、8、及び10では免疫血清をプローブとして用いた。独立に調製された2つの可溶性タンパク質サンプル (IPTC添加 #1及び#2、レーン3~6) について検討した。

20

図5 酵素活性を有する組み換えr-HCV RNA依存性RNAポリメラーゼ。精製された組み換えポリオウイルスRDRP (約50ng)、及びr-HCV RDRPを発現している大腸菌 (HCV RDRP溶解物) 又はRDRPを発現していない対照細胞 (対照溶解物) から得られた等量の可溶性タンパク質 (約1µg) のポリ (U) ポリメラーゼ活性を示す。インキュベーションは、既述のようにして行い、30分 (1サンプル) 及び60分 (2サンプルの平均) のインキュベーション後の、15µlのインキュベーションから回収されたポリ (U) のCPMを示した (J. Virol. (1986) 58: 790-796)。

30

図6 部分的に精製された組み換えHCV RNA依存性RNAポリメラーゼの酵素アッセイ。r-HCV RDRPを発現している大腸菌の溶解液を調製し、図5と同様にして酵素アッセイを行った。示された実験においては、RDRPが樹脂に結合できるようなpH及びバッファーの条件下で、バッチ精製法でDEAE樹脂を用いた。細胞溶解物 (RDRP溶解物と示されている)、及び溶解物とほぼ同じ濃度にまで濃縮された、0.5MのNaClでDEAE樹脂から溶出されたタンパク質 (DEAEバッチと示されている) から得られた等量のタンパク質をアッセイした。DEAE樹脂及び他の試験樹脂を用いたさらなる試験で、RDRP酵素活性の部分精製が、ウサギ抗血清を用いたイムノブロッティング及び図4に概説された方法により検出される、タンパク分解されていないRDRPの量の増加と相関することが示された。

40

図7 組み換えr-HCV RDRPのイムノアフィニティ精製。この写真複写物は、ウサギポリクローナルプロテインAセファロースで精製された抗RDRP抗体を用いて調製されたイムノアフィニティカラムでの最初の結果を示す。出発物質は、組み換えr-HCV RDRPを発現している大腸菌から可溶化されたタンパク質であった。図は、異なる洗浄剤の条件でタンパク質が適用された2つの同一のカラムから溶出されたタンパク質のイムノブロットを示す。レーン1は、20mMトリス (pH7.5)、100mM KCl、0.5mM EDTA、1mM DTT、5% グリセロール、及び0.05% Triton X-100中で可溶化された組み換えRDRPと共に一晩混合された抗体/セファロースビーズから溶出されたタンパク質を示す。これらのビーズを、翌朝10mMリン酸カリウムバ

50

ッファー (pH 7.2) で洗浄し、タンパク質を 100 mM グリシン (pH 2.5) で溶出した。溶出したタンパク質を 1 M トリス (pH 8.0) 中に回収し、pH を再調整した。カラムから溶出したタンパク質を、図 4 と同様に、SDS-PAGE 及びイムノブロッティングにより分析した。レーン 2 は、0.05% Triton X-100 の代わりに 0.05% NP-40 を使用したこと以外は同一の出発物質と共に混合した同一のビーズから溶出したタンパク質を示す。r-HCV RDRP の位置が示されている。

発明の詳細な説明

定義

「RDRP」とは、RNA 合成を触媒する酵素である、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを意味する。これにより合成された RNA は RNA 鋳型と相補的な配列を有する。「HCV-RDRP」は C 型肝炎ウイルスの RDRP である。本明細書において開示される修飾された HCV-RDRP は、r-HCV-RDRP と称す。HCV ゲノムの NS5B と呼ばれる領域は、前記のワクシニアウイルス発現系を用い、HCV ポリタンパク質のタンパク質分解産物として同定されている。NS5B のヌクレオチド配列は配列番号 1 に含まれている。NS5B 配列をコードする推定アミノ酸は、ヌクレオチド 7 から開始する。配列が 5' 末端で欠失している場合、残りの配列は、終止コドンは含まずに、残りのコーディング配列の最初と最後のヌクレオチド番号により表記される。例えば、NS5B₃₄₋₁₇₇₉ とは、配列番号 1 のヌクレオチド 34 ~ 1779 を含む NS5B の一部を示す。

本明細書において例示される r-HCV-RDRP をコードするアミノ酸配列は、配列番号 2 に示されている。NS5B によりコードされるアミノ酸配列は、配列番号 2 の第 3 のアミノ酸から開始する。NS5B によりコードされる配列が N 末端で欠失している場合、残りの配列は、ⁿNS5B と表記される。ここで、n は NS5B の N 末端から欠失したアミノ酸の数である。例えば、⁹NS5B は、配列番号 2 中のアミノ酸 12 ~ 593 の配列である。

記載されたように、本発明により、種々の r-HCV-RDRP 構築物が企図される。本発明に含まれる修飾コーディング配列は、以下のような一般配列を有する。

ATG - N_x - (N^S) (N^M) (N^S) (N^Y) (N^S) (N^W) (N^T) (N^G) (N^A) - [NS5B₃₄₋₁₇₇₉]

ここで、N_x は 0 ~ 20 アミノ酸をコードする任意のヌクレオチド配列であり、N^S はセリンをコードするコドンであり、N^M はメチオニンをコードするコドンであり、N^Y はチロシンをコードするコドンであり、N^W はトリプトファンをコードするコドンであり、N^T はトレオニンをコードするコドンであり、N^G はグルタミン酸をコードするコドンであり、N^A はアラニンをコードするコドンである。括弧内のコдонはいずれも、必要ならば、欠失してもよい。必要ならば、最大 5 個の括弧内のコдонを変異させることができる。「変異」という用語は、NS5B 配列により本来コードされるアミノ酸とは異なるアミノ酸をコードするよう変化していることを意味する。例えば、既知のアラニン・スキニング突然変異導入法により、個々のコдонをアラニンをコードするよう変化させることができる。アラニン・スキニング突然変異導入法は、機能に負の影響を実質的に与えることなく、置換に耐性のアミノ酸部位を同定するための迅速かつ便利な方法を提供する。アラニン・スキニングにより置換耐性であることが明らかになった部位は、他のアミノ酸置換に対しても耐性である可能性が高い。好ましい置換残基は、金属 (例えばニッケル) カラム用のアフィニティリガンドとして機能する、一つ又は複数のヒスチジン残基である。ヒスチジンの存在により、カラムへの選択的な結合性が提供され、r-HCV-RDRP の精製が促進される。定義されたとおり、[NS5B₃₄₋₁₇₇₉] とは、配列番号 1 の残りのヌクレオチド配列、終止コдонを含まないヌクレオチド 34 ~ 1779 を示す。前記の配列を作製する方法は、いずれの配列についても、N_x が GCT であり、NS5B によりコードされる最初の 9 個のアミノ酸をコードする括弧内のコдонがいずれも欠失していない配列についての下記の方法と本質的に同様である。適切な発現ベクターへの挿入を容易にするため、所望の制限部位配列と組み合わせた所望の配列のためのプライマーを合成できることは明らかであろう。ベクターの選択は、宿主細胞、所望のプロモーター型、及び、r-H

10

20

30

40

50

C V - R D R P と共発現させる付加配列の有無を含む、当該技術分野において既知の要因に基づく。反応条件、P C R、ベクターの挿入、及び宿主細胞の培養は、以下に記載されるか、又は当該技術分野において周知のものである。

r - H C V - R D R P に対してさらなる修飾を行うことができる。G l y - A s p - A s p モチーフを含まない C 末端領域の約 25 % の欠失を構築し (r - H C V - R D R P - C)、その活性を試験した。タンパク質は発現し、抗 R D R P 血清を用いたイムノブロッティングにより検出することができたが、r - H C V - R D R P - C を発現している大腸菌の溶解物は、ポリ (U) アッセイにおいても、鋳型としてグロビン m R N A を用いた場合にも、測定可能な活性を示さなかった。しかし、モデリング試験に基づく、C 末端に近い N S 5 B のアミノ酸 565 ~ 572 (配列番号 2 の 565 ~ 574) の領域が、タンパク質表面に露出していると考えられる。部位特異的突然変異導入法を用いて、コード配列を A r g 570 H i s、A r g 572 H i s、及び T r y 573 H i s へと変化した (配列番号 2 の番号を用いた)。タンパク質の一端付近の表面領域に一つ又は複数の付加ヒスチジン残基をクラスター形成させることにより、酵素活性には実質的に影響を与えることなく、金属アフィニティクロマトグラフィーによる精製が容易になる。現存のアミノ酸をヒスチジンに置換する突然変異導入のための部位となりうる他の推定表面領域には、配列番号 2 におけるアミノ酸 47 ~ 56、152 ~ 159、183 ~ 184、210 ~ 215、269 ~ 272、384 ~ 391、及び 439 ~ 442 が含まれる。

r - H C V - R D R P は事実上いかなる宿主細胞型で発現させることもできるが、阻害剤試験のようなインビトロ試験において有用であるためには、酵素は可溶型であることが好ましい。細胞内で合成される場合には、酵素を可溶化する工程を実施しない限り、酵素は細胞溶解物中で不溶型で存在する。一般的には、宿主細胞を回収し、濃縮し、その後、例えば宿主細胞壁加水分解酵素の使用、超音波処理などの既知の方法により溶解し宿主細胞を破壊する。一般的には、細胞溶解により放出されるタンパク分解酵素から保護するため、プロテアーゼ阻害剤を添加する。非イオン性洗浄剤を使用することもできる。超音波処理された細胞及び細胞内複合体を、上記の成分の存在下、凍結させ、解凍させる。残存する粒子物質を 10,000 ~ 35,000 x g で遠心分離することにより除去する。r - H C V - R D R P は上清に残る。大腸菌において発現された r - H C V - R D R P を可溶化するための詳細なプロトコルは後述する。

当該技術分野において既知の技術及び手段により、酵素のさらなる精製が達成される。その方法には、これらに限定されないが、抗体アフィニティクロマトグラフィー、金属結合アフィニティクロマトグラフィー (付加ヒスチジン残基を有する修飾型酵素に特に適した方法である) が含まれ、さらに通常のイオン交換カラム、硫酸アンモニウムによる選択的な沈殿、及び本明細書に具体的に記載された方法に限定されない当該技術分野において既知の他の方法が含まれる。本明細書において「精製された形態」とは、可溶化細胞溶解物中で測定された活性よりも少なくとも 4 倍大きい特異的活性を有する酵素調製物を意味する。

r - H C V - R D R P に対する抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を形成するための様々な既知の方法により作製することができる。r - H C V - R D R P に対する抗体は、感染細胞の H C V - R D R P にも結合する。このことは、抗体リガンドとして r - H C V - R D R P を用いて、H C V 感染患者の血清中に H C V - R D R P に対する循環抗体を検出することができるという知見により示された。当該技術分野において周知のように、r - H C V - R D R P の異なるエピトープに対して親和性を有する様々なモノクローナル抗体を選択することができる。酵素活性を阻害する抗体も存在する。抗体とアフィニティカラムとを結合させ、次に酵素を不活化しないような条件で溶出を行うことが容易にできるような適度な親和性を有する抗体も存在する。

ある種の目的、特に H C V - R D R P 阻害剤のインビトロスクリーニング及び細胞培養物中で H C V を増殖させることができる細胞系の樹立のためには、哺乳動物細胞が好ましい宿主細胞である。形質転換に使用される既知の細胞系はすべて、原則的に、r - H C V - R D R P を発現させるために形質転換することができる。好ましい細胞系は、H C V、又

10

20

30

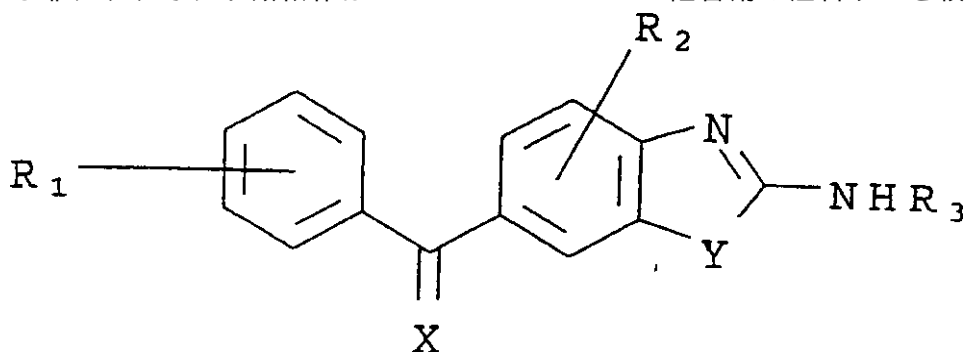
40

50

はフラビウイルスなどの類似のウイルスが感染することが知られている組織に由来するものである。このような細胞系には、例えば、ヒトマクロファージ細胞系 U 9 3 7、ヒト肝臓由来 h e p G 2 細胞、及びブタ腎臓細胞系 P K 1 5 が含まれる。最近発見された H C V - R N A の 3 ' 末端近傍のセグメントは、H C V - R D R P を調節する（宿主がコードしている可能性がある）タンパク質又はペプチドとの相互作用部位である可能性が高い推定クローバー葉型二次構造を有する（Tanaka, T., et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 215: 744, 749）。このような調節は、r - H C V - R D R P 及び野生型酵素の鋳型特異性又は触媒活性の変化という形をとる。調節タンパク質を通常発現している細胞における r - H C V - R D R P の発現は、r - H C V - R D R P の発現が H C V 感染細胞における発現の様式と極めて類似したインビボ細胞系を提供する。また、細胞中に活性 H C V - R D R P が存在すると、H C V 複製のための「ジャンプ・スタート（jump start）」を提供することにより、感染により導入された H C V、又は形質転換により導入されたゲノミック H C V R N A の複製を増強することができる。最も重要な点として、形質転換細胞における r - H C V - R D R P 活性を測定できることが、インビボでの酵素阻害能について H C V - R D R P の潜在的な阻害剤をスクリーニングするための重要な鍵となる。

インビトロの r - H C V - R D R P による R N A 合成のアッセイにより、ポリ（A）鋳型を用いるポリ（U）の合成及びグロビン m R N A 鋳型を用いる R N A の合成を酵素が触媒できることが示されている。いずれの反応も、記載された反応条件下で、90%を超えてプライマー依存性であった。酵素は、Mg⁺⁺の非存在下では検出可能な活性を示さず、約 20mM の Mg⁺⁺の存在下で最大の活性を示した。抗ウイルス活性を有する化合物をスクリーニングするための方法は、様々な化合物がインビトロで R D R P 酵素活性に対して及ぼす効果を試験することにより提供される。インビトロ法には、被検化合物の存在下及び非存在下で合成された R N A 量を比較することが含まれる。被検化合物の非存在下での対照反応と比較して、被検化合物の存在下での反応で合成された R N A の量が減少している場合、阻害効果が示唆される。

r - H C V - R D R P を発現している安定的に形質転換された細胞系は、完全な哺乳動物細胞内でポリメラーゼを阻害する化合物をインビボスクリーニングするために、特に有用である。このような阻害剤は、感染細胞において H C V 複製の阻害剤となる可能性が高い。インビボ試験は、細胞毒性を有する化合物、及び充分量において細胞に侵入することができない化合物を選別除外するという点で有利である。また、さらに、実際の阻害剤の前駆体であり、細胞代謝過程により阻害剤へと変換される化合物を試験することも可能である。前駆体阻害剤の例としては、活性な阻害剤へと変換されるためにはリン酸化される必要があるヌクレオシド類似体、及び細胞内で加水分解を受け活性な阻害剤を形成するような結合により保護された活性基を有する化合物が含まれる。下記に示す一般構造を有する非ヌクレオシド類似体は r - H C V - R D R P 阻害剤の注目すべき候補と考えられる。



式中、R₁及びR₂はアルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、又はハロ基であり、R₃はアルキル基、アリール基、水酸基、又はアルコキシ基であり、XはO、N R₃、O、C H₂、又はC H R₃である。一般的に、被検細胞は、発現するために r - H C V - R D R P の作用を必要とするような、又は r - H C V - R D R P が存在すると発現が増強されるようなレポーター構築物でさらに形質転換される。レポーター遺伝子は当該技術分野にお

いて周知であり、ルシフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼ及び蛍光グリーンタンパク質 (fluorescent green protein) を含むが、これらに限定されない。これらはすべて商業的に入手可能である。注目すべき方法は、レポーターのアンチセンス遺伝子、すなわちアンチセンスを発現するレポーター遺伝子型、又はレポーター遺伝子の (-) 鎖メッセンジャー RNA を使用するというものである。この場合、RNA 中のセンス (+) 鎖が作製され、活性なレポーターへと翻訳されるために、RDRP の活性が必要となる。この系には、RDRP が阻害される場合、活性 HCV - RDRP の非存在下でのレポーター活性のバックグラウンドレベルが存在しないという利点がある。適切な (-) 鎖レポーター遺伝子の構築の概略は後述する。

材料及び方法

材料 - 特に断りのない限り、化学物質はすべてフィッシャー (Fisher) から購入し、酵素はすべてギブコ BRL (Gibco BRL) から購入した。AmpliTaq はパーキン・エルマー (Perkin-Elmer) から購入した。他の PCR 及びライゲーション用成分はすべてインビトロジェン (Invitrogen) から購入した。リゾチーム、抗生物質、及び染色済タンパク質標本はシグマ (Sigma) から購入した。ヌクレオチド及びポリ (A) はファルマシア (Pharmacia) から購入した。[³H -]UTP はデュポン NEN (Dupont NEN) から購入した。オリゴ (U) はイー・エーレンフェルド (E. Ehrenfeld) 氏 (カリフォルニア大学, Irvine) の好意で贈られたものである。

HCV NS5B 領域のサブクローニング - ワクシニアウイルス発現試験により推定された N 末端 (Lin, C. et al. (1994) 前出; Grakoui, A. et al. (1993) 前出)、及び HCV ポリタンパク質の読み取り枠の末端に基づく C 末端 (Choo, Q-L. et al. (1991) 前出) に基づき、NS5B 領域の増幅用の PCR プライマーを設計した。鋳型は本来のプロトタイプ HCV (1a 型) クローン (CDC から得た) (Choo, Q-L. et al. (1989), (1991), 前出) であった。以下のプライマー、5' - ATA GCT AGC ATG TCT TAC TCT TGG ACA GG - 3' (配列番号 3) 及び 5' - ATA GGA TCC TCA TCG GTT GGG GAG GAG G - 3' (配列番号 4) を使用して、N 末端に最少の変化を有する NS5B 領域 (SMSY 配列番号 7 の代わりに ASMSY 配列番号 5) を増幅し、方向性をもって NheI 及び BamHI 制限部位で pET - 11a (Novagen) へとクローン化した (Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York)。PCR 増幅された遺伝子には、5' 末端に NheI 部位、3' 末端に BamHI 部位が組み込まれていた。この構築物は、ワクシニアウイルス発現試験により推定された推定野生型 NS5B タンパク質の SMSY アミノ末端ではなく、MASMSY というアミノ末端配列を有する組み換えタンパク質の合成をもたらす。

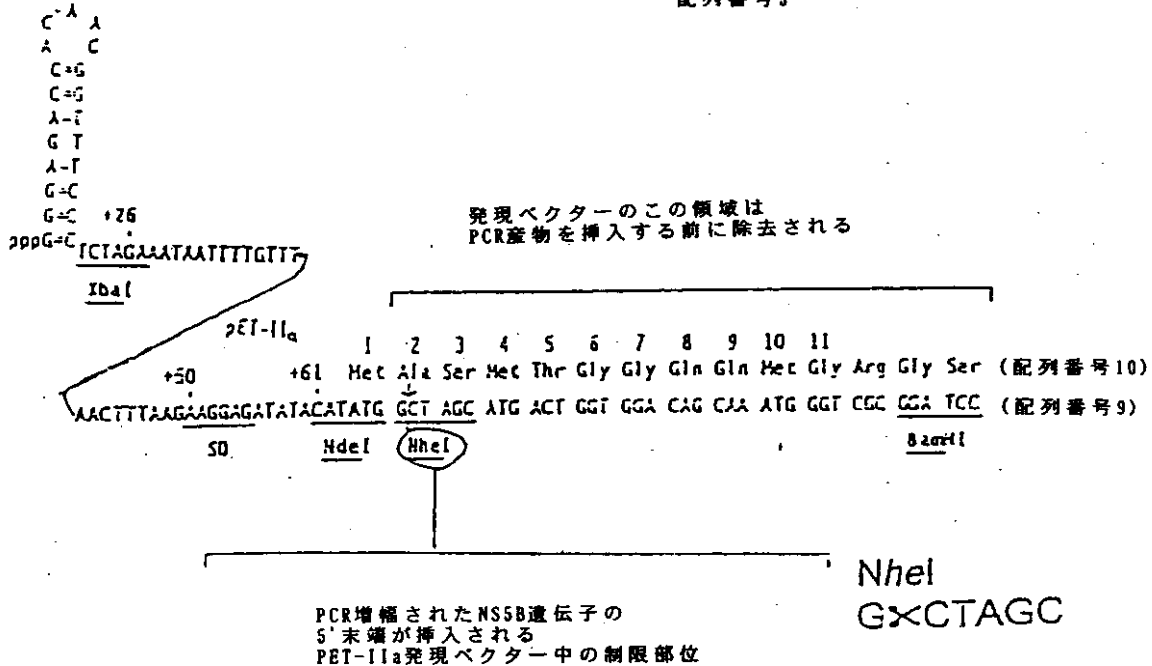
10

20

30

A S M S Y S W T (プライマー中にコードされるアミノ酸、配列番号8)

5'-ATA GCT AGC ATG TCT TAC TCT TGG ACA GG-BC型肝炎ウイルスcDNAの
 ↑ NS5B遺伝子の
 5'末端用のPCRプライマー
 NheI切断部位
 配列番号3



PCR反応は、まず94 で2分間インキュベートし、次に94 1分、55 2分、及び72 3分を20サイクル行った(コイコーポレイション テンプサイクラー (Coy Corporation Tempcycler) II)。さらに7分間72 に維持した後、4 に冷却することにより、反応を完了させた。増幅されたDNAをフェノール/クロロフォルム抽出により精製し、NheI及びBamHIで消化し、フェノール/クロロフォルム抽出及びエタノール沈殿を用いて再精製した。

T4リガーゼを用いて、3:1比(挿入配列:ベクター)で、14.5で一晩、挿入配列とベクターとを連結させた(Maniatis, 前出)。連結された物質を用いて、CaCl₂法により大腸菌(インビトロジェンのTop10(登録商標))を形質転換した。アンピシリンプレート上でコロニーを選択し、単一コロニーから単離したプラスミドDNAのミニプレップを、制限酵素分析を用いて特徴解析した。ミニプレパレーション法により得られたプラスミドDNAを用いて、BL21(DE3)大腸菌(ノバジェン(Novagen))を形質転換し、プラスミドを含有する生物をアンピシリンを用いて選択し、単一コロニー由来のプラスミドDNAのミニプレパレーションを、制限酵素消化により解析した。

推定HCV RDRPの発現、精製、及び可溶化 - 上記のpET-11a-NS5B構築物を含有するBL21(DE3)大腸菌を一晩培養し(カルベニシリンを含むM9ZB培地)、翌朝新鮮培地で20倍に希釈した。培養培地のOD₆₀₀が0.6に達するまで、細胞を37 でインキュベートした。その後、IPTGを添加して最終濃度を1mMにした。推定RDRPの発現をサンプルバッファー中で90 で溶解した完全な細胞をSDS-PAGE分析することにより追跡した。

非変性条件下でRDRPを可溶化するため、IPTG誘導の2時間後細胞を回収した。氷上で20分間、20mMトリス(pH7.5)、100mM KCl、0.5mM EDTA、1mM DTT、0.1% Triton X-100、及び30 µg/mlリゾチーム中で細胞を溶解することにより、RDRPを可溶化した。サンプルを氷上で0.5インチのプロープ(パルスセッティング)を用いて5分間(Ultrasonics Inc. W-225, アウトプット-セッティング7)超音波処理し、遠心分離(19,000g、4、30分間)を行った。これらの調製物から得られた不溶性画分(ペレット)には、RDRPが多く含まれていた。ペレットをSDS-PAGEサンプルバッファーに懸濁し、90 で10分間加熱し、SD

S - P A G E ゲルの R D R P マーカーとして使用した。しかし、以下のプロトコルに記載するように、活性な酵素は上清に観察された。

組み換え R D R P を可溶化する方法の概略

- 1 . 5 g の大腸菌ペレットを解凍する。
- 2 . 5 g のペレットを以下の溶液に再懸濁する。
- 4 5 ml 溶解バッファー
- 4 0 μ l 1 0 0 mM P M S F (及び他のプロテアーゼ阻害剤)
- 1 5 0 μ l リゾチーム (1 0 mg/ml)

溶解バッファー :

- 2 0 mM トリス (pH 7 . 5) (4)
 - 0 . 5 mM E D T A
 - 1 0 0 mM K C l
 - 1 mM D T T
 - 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0 (又は 0 . 1 % N P - 4 0)
 - 1 0 . 0 % (v / v) グリセロール
 - 3 . サンプルを氷上に 2 0 分放置し、次に 5 分間超音波処理 (パルスモード ; 6 ~ 7 の間のセッティング) する。超音波処理の間、混合する。
 - 4 . 瞬時の超音波処理 (sonicating flash) 後、溶解物を液体窒素中で凍結させる (溶解物を約 1 ~ 2 分間液体窒素中に投入する) 。
 - 5 . 3 7 ° の水浴で溶解物を急速に解凍する。
 - 6 . 溶解物を 1 分間超音波処理する。
 - 7 . 超音波処理したサンプル混合物 4 5 ml につき 5 ml の溶解バッファーをさらに添加する。
 - 8 . 全超音波処理済サンプルを 5 0 ml の画分 (フィッシャー 5 0 ml チューブ) に分割する。
 - 9 . 溶解物を、ベックマン (Beckman) J - 1 7 ローター中、1 2 , 5 0 0 rpm (又はソバル (Sorvall) S S - 3 4 ローター中、1 2 , 5 0 0 rpm) 、2 0 分間の遠心分離にかける。
 - 1 0 . 上清を清潔な (無菌の) 5 0 ml フィッシャーチューブにとり、無菌タンパク質等級のグリセロールを最終濃度 1 0 % (例えば、4 0 ml の上清に対し 4 . 4 4 ml のグリセロール) で添加した。この溶液を 4 ° で保存し、酵素活性を有する H C V R D R P の精製のための出発物質として使用した。
- 以下の工程を、単独で、又は組み合わせて用いることにより、さらに精製を行う。

10

20

30

組み換えHCV RDRPを発現している大腸菌溶解物由来の可溶性タンパク質
(10,000×g上清)

↓

45%硫酸アンモニウム沈殿したタンパク質

(続いて10%グリセロール及び1mM DTTを含むトリス (pH7.5) で透析)

↓

DEAE陰イオン交換クロマトグラフィー

(pH8.5のトリスバッファーで出発物質を適用、同バッファーで洗浄、0~0.5M NaCl勾配で酵素を溶出)

↓

ホスフォセルロースクロマトグラフィー

(酵素を含む濃縮DEAE画分を希釈して塩濃度を低下させ、pHを8.0 (トリス/塩酸) に変化させた後、サンプルをカラムに適用し、洗浄し、0~0.5M NaCl勾配で溶出)

↓

FPLCゲル濾過クロマトグラフィー

(Superose12HR10/30ーファルマシア) (出発物質を濃縮し、バッファーをトリス (pH8.0) を含む150mM NaClへと交換し、0.3ml/分の流速で200μl量を適用)

↓

酵素アッセイ用の組み換えHCV RDRP

(トリス (pH8.0)、100mM NaCl、20% グリセロール、0.1% NP-40及び1mM DTTと共に-70℃でアリコートで保存)

すべてのタンパク質精製工程と同様、バッファー、pH、及びその他の条件は、HCV RDRPの精製がより最適化されるよう修飾することができる。追加される最終精製工程 (又はFPLCゲル濾過工程の代わりの工程) は、pH6.0でMESバッファーを用いたMono-S陽イオン交換クロマトグラフィー工程である (酵素の等電点は約8.8である)。すべての精製工程において、RDRPアッセイを用いて酵素活性、総タンパク質量をモニターし、SDS-PAGE分析を行う。

ウサギ抗HCV RDRP血清 - 上記のようにしてペレット画分から可溶化されたRDRPを調製用SDS-PAGEにより分離し、ウサギを免疫するために用いた。動物を、既に詳細に開示されている方法 (Harlow, E. and D. Lane (1988) Antibodies: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 553-611) で、4~5週の間隔で免疫した。

10

20

30

40

50

イムノブロットング分析 - イムノブロットは、既に開示されている方法に、二次H R P 結合抗体を増幅化学発光系 (E L C , アメルシャム (Amersham)) と共に用いるという修飾を加えて行った。ウサギ血清を一次抗体として用いる場合には、二次抗体は抗ウサギ免疫グロブリンであった。ヒト血清をスクリーニングする場合には、二次抗体は抗ヒト免疫グロブリンであった。慢性C型肝炎に感染していることが証明されている患者由来の血清は、疾病の管理と予防センター (Centers for Disease Control and Prevention) (アトランタ) のマイケル・ビーチ博士 (Dr. Michael Beach) から提供された。

ポリ (U) ポリメラーゼアッセイ - 可溶性画分中の酵素活性は、鋳型としてポリ (A) 、プライマーとしてオリゴ (U) を用いたポリ (U) ポリメラーゼアッセイにより測定した (Hey, T.D. et al. (1986) J. Virol. 58: 790-796) 。 サンプル (およそ 2 μ l) を、 5 0 mM H E P E S (pH 8 . 0) 、各 5 0 0 μ M の A T P 、 C T P 、及び G T P 、 4 mM D T T 、 3 mM M g A c ₂ 、ならびに 6 0 μ M Z n C l ₂ を含む 5 0 μ l のインキュベーション中でアッセイした。 1 5 μ M の濃度の [³ H] U T P (特異的活性 : 2 7 Ci/mol) も添加した。各インキュベーション中に、 1 μ g のポリ (A) 、そしてプライマーとして 0 . 5 μ g のオリゴ (U) を加えた。

インキュベーションを 3 0 で 3 0 ~ 6 0 分間行い、 [³ H] ポリ (U) をキャリヤ D N A の存在下、 T C A で沈殿させ、ワットマン (Whatman) G F / C フィルターで回収した。フィルターを 0 . 1 M ピロリン酸ナトリウム / 1 N 塩酸及び 9 5 % エタノールの各々で洗浄した。 [³ H] ポリ (U) は、液体シンチレーション分光光度測定法 (LKB 1218 ラックベータ (RackBeta)) により定量した。

リポフェクチンを用いた新生ハムスター腎臓 (B H K) 細胞の安定的形質転換
1 日目 (午後)

形質転換のため 5 0 % のコンフルエンス状態になるように B H K 細胞を 6 穴プレートに分割する。

2 日目 (午後 4 時以降)

滅菌チューブ中で以下の溶液を調製する。

(A) 5 0 μ l ミニプレップ D N A + 5 0 μ l 無血清培地 (D M E M / F 1 2)

(各 2)

(B) 6 . 2 5 μ l リポフェクチン (ライフ テクノロジーズ (Life Technologies) , Gaithersburg, MD) + 9 3 . 7 5 μ l 培地

(C) 1 2 . 5 μ l リポフェクチン + 8 7 . 5 μ l 培地

(D) 6 . 2 5 μ l リポフェクチン + 1 9 3 . 7 5 μ l 培地 (モック形質転換)

(E) 1 2 . 5 μ l リポフェクチン + 1 8 7 . 5 μ l 培地 (モック形質転換)

A と B 、及び A と C を穏和に混合し、室温で 1 5 分間 D N A とリポフェクチンを反応させる。この間、細胞を 2 ml の D M E M / F 1 2 で 2 回洗浄する。 D N A / リポフェクチン複合体に 1 . 8 ml の D M E M / F 1 2 を添加し、それを穏和に攪拌しながら細胞へと添加する。インキュベーター中に一晚細胞を放置する。

3 日目 (午前 9 時)

D N A / リポフェクチンを取り出し、 3 ml の培地 + 血清を細胞に添加する。細胞を 3 0 ~ 4 8 時間インキュベートする。 1 : 2 0 、 1 : 5 0 、 1 : 1 0 0 の細胞を、 1 0 ml の 6 0 0 μ g/ml ゲネチシンを含む培地 + 血清で、 1 0 cm のプレートに分割する。選別のため 3 ~ 7 日間、コロニー形成のため 1 0 ~ 1 4 日間放置する。形質転換効率を改善するため、リポフェクチンの代わりにスターバースト・デンドリマー (Starburst Dendrimer) (ライフ テクノロジーズ、Gaithersburg, MD) を用いても、同じプロトコルを適用できる。

選別後、クローンコロニーを 2 4 穴プレートに播き、コンフルエンス状態のウェルの培地の R D R P 活性をアッセイする。細胞は、 6 0 0 μ g/ml のゲネチシン中で維持する。

完全な細胞に侵入し H C V R D R P を阻害する化合物を同定するための、安定的形質転換細胞の H C V R D R P 発現の使用

形質転換細胞における H C V R D R P の阻害剤候補の効果を決定するための最も直接的な方法は、細胞を化合物と共にインキュベートし十分に洗浄した後、細胞抽出物中の R D

10

20

30

40

50

R P 活性を直接的に測定することである。これは、本明細書に記載の R D R P アッセイにより (H C V 鋳型を用いて) 行うことができ、細胞系以外には新たな改良を必要としない。簡単に述べると、活性酵素を最大に発現する条件下で、そしてその後の酵素アッセイに十分な量で、細胞をインキュベートする。被検化合物をインキュベーション中に添加し、所望の時間に培地を除去し、細胞外被検化合物を除去するため細胞を十分に洗浄する。本明細書に記載の一般的な方法に従い、細胞抽出物を R D R P アッセイ用に調製する。この方法は比較的迅速に行われ、本発明者らの現在の方法にほんのわずかな変更 (新しい細胞系) を必要とするのみである。阻害剤の動力学的研究 (細胞内で阻害がどの程度の速度で生じるか) を完全な細胞で行う必要がある場合には、同じインキュベーションを 2 つ行う。この方法で考えられる唯一の問題点は、細胞には侵入しない化合物が、調製中に細胞溶解物へと混入してしまう可能性があることである。この起こりうる問題を回避するためには、至適な「洗浄」工程がどのようなものであるのかを決定することが必要である。この系の主要な利点は、精製 R D R P を用いて試験するには面倒な大きな修飾 (ヌクレオシドのリン酸化) をする必要がある化合物を、迅速にスクリーニングできることである。より迅速なスクリーニングは、潜在的な阻害剤と共にインキュベートした細胞に、容易に測定できるレポーター分子 (分泌アルカリホスファターゼ又はルシフェラーゼ等) もコードする H C V R N A 鋳型を発現するよう遺伝子操作されたプラスミドを、一過性形質転換することにより行いうる。このような系により、完全な細胞における H C V R D R P 活性が測定される (阻害濃度は細胞の溶解などにより希釈されない)。R D R P 活性が阻害される細胞を迅速にスクリーニングすることにより、多数の阻害剤候補を迅速にスクリーニングすることができる。

10

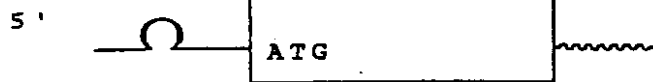
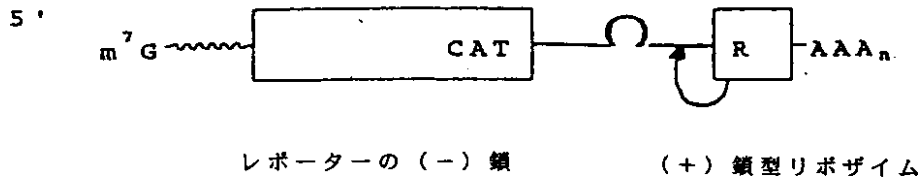
20

宿主細胞内で発現した r - H C V - R D R P の活性がレポーター遺伝子の発現に必要なようなレポーター系が開発されている。m R N A として発現した際に H C V 複製中間体と類似するような構造中にレポーターコーディング配列をアンチセンス型で保持するように設計された構築物で、宿主細胞を形質転換する。m R N A には、5' 末端から始まり、キャップ部位、アンチセンス型、すなわち (-) 鎖型のレポーターコーディング領域、同様に (-) 鎖型の H C V 内部リボソーム侵入部位 (internal ribosome entry site) (I R E S) 因子、(+) 鎖型のリボザイム配列、及び (+) 鎖型のポリアデニル化部位が含まれる。このような m R N A は、翻訳されると、レポーター遺伝子の (-) 鎖によりコードされるナンセンスタンパク質を生じる。しかし、相補鎖が r - H C V - R D R P により合成されると、(+) 鎖のコーディング配列がレポータータンパク質 (例えば、ルシフェラーゼ、蛍光グリーンタンパク質、分泌アルカリホスファターゼなど) として翻訳可能になる。相補鎖合成は細胞質で起こり、キャップ構造付加は宿主細胞核で起こるため、R D R P により生成された相補鎖には、キャップ構造を有する 5' 末端が欠けている。しかし、H C V - I R E S 因子の存在により、キャップ非依存性翻訳が可能となる (I R E S 因子は、相補鎖中の (+) 鎖コーディング配列の 5' 側に位置する)。リボザイムモチーフの機能は、R D R P による相補鎖合成の前に、(-) 鎖の 3' 末端からポリ (A) 尾部を除去し、付随的にそれ自身が除去されることである。適切なリボザイムモチーフは、例えば、デルタ型肝炎ウイルスの R₂89_{cc} により提供される。取り込まれた D N A から転写されるとき、R N A 中のレポーターは以下のように図示される。

30

40

(－) 鎖型 IRES



(＋) 鎖型 IRES ・ レポーターの (＋) 鎖

前述の構造への付加には、 r -HCV-RDRP活性を調節又は増強しうる二次構造を提供する、HCV 3' 非翻訳領域の配列の提供が含まれる。 r -HCV-RDRPの作用により、レポーター遺伝子が発現し、蛍光、化学発光、又は色素生成反応のような容易に同定可能な反応の産物が生じる。このような反応産物の存在により、間接的に、宿主細胞で発現した r -HCV-RDRPの活性が示され、したがって、インビボでの r -HCV-RDRP活性に対する被検化合物の効果を観察するための手段が提供される。インビボでの r -HCV-RDRP活性の阻害剤は、HCVに対する抗ウイルス剤となる可能性がある。

本発明を、具体的な実施態様及び実施例に関して詳細に開示してきたが、本明細書に記載された一つ又は複数の教示、原理、及び結果を、本発明の範囲に含まれる、当業者により適用される当該技術分野における知識と組み合わせることにより、さらなる実施態様、実施例、及び変更が行われうるということが理解されるであろう。

配列表

(1) 全体的情報：

(i) 出願人：ハーゲドーン、カート エイチ。(Hagedorn, Curt H.)

アル、レイノルドス エイチ。(Al, Reinoldus H.)

(ii) 発明の名称：組み換えC型肝炎ウイルスRNAレプリカーゼ

(iii) 配列の数：10

(iv) 連絡先：

(A) 名宛人：グリーンリー、ウィナー アンド サリバン、ピー・シー。(Greenlee, Winner and Sullivan, P.C.)

(B) 街路：5370 マンハッタン サークル (Manhattan Circle)、スウィート (Suite) 201

(C) 市：ボルダー (Boulder)

(D) 州：コロラド

(E) 国：米国

(F) ZIP：80303

(v) コンピュータ可読形態：

(A) 媒体の型式：フロッピーディスク

(B) コンピュータ：IBM PC互換型

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn リリース # 1.0、バージョン # 1.3.0

(vi) 最新の出願データ：

(A) 出願番号：米国

(B) 出願日：1996年9月27日

(C) 分類：

(vii) 先願のデータ：

(A) 出願番号：US 60/004383

(B) 出願日：1995年9月27日

(viii) 弁理士／代理人の情報：

(A) 名称：グリーンリー、ローランス エル． (Lorance L.)

(B) 登録番号：27,894

(C) 参照／書類番号：76-95US

(ix) 遠隔通信情報：

(A) 電話：(303) 499-8080

(B) テレファックス：(303) 499-8089

10

(2) 配列番号1に関する情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：1788塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジ：該当なし

(ii) 配列の種類：cDNAないしmRNA

(iii) ハイボセチカル：No

(ix) 特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

20

(B) 存在位置：1..1782

(xi) 配列の記載：配列番号1：

ATG GCT AGC ATG TCT TAC TCT TGG ACA GGC GCA CTC GTC ACC CCG TGC 48

Met Ala Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys

1

5

10

15

GCC GCG GAA GAA CAG AAA CTG CCC ATC AAT GCA CTA AGC AAC TCG TTG 96

Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu

20

25

30

CTA CGT CAC CAC AAT TTG GTG TAT TCC ACC ACC TCA CGC AGT GCT TGC Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Cys 35 40 45	144	
CAA AGG CAG AAG AAA GTC ACA TTT GAC AGA CTG CAA GTT CTG GAC AGC Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Ser 50 55 60	192	
CAT TAC CAG GAC GTA CTC AAG GAG GTT AAA GCA GCG GCG TCA AAA GTG His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser Lys Val 65 70 75 80	240	10
AAG GCT AAC TTG CTA TCC GTA GAG GAA GCT TGC AGC CTG ACG CCC CCA Lys Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr Pro Pro 85 90 95	288	
CAC TCA GCC AAA TCC AAG TTT GGT TAT GGG GCA AAA GAC GTC CGT TGC His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Cys 100 105 110	336	
CAT GCC AGA AAG GCC GTA ACC CAC ATC AAC TCC GTG TGG AAA GAC CTT His Ala Arg Lys Ala Val Thr His Ile Asn Ser Val Trp Lys Asp Leu 115 120 125	384	20
CTG GAA GAC AAT GTA ACA CCA ATA GAC ACT ACC ATC ATG GCT AAG AAC Leu Glu Asp Asn Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn 130 135 140	432	
GAG GTT TTC TGC GTT CAG CCT GAG AAG GGG GGT CGT AAG CCA GCT CGT Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg 145 150 155 160	480	30
CTC ATC GTG TTC CCC GAT CTG GGC GTG CGC GTG TGC GAA AAG ATG GCT Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala 165 170 175	528	
TTG TAC GAC GTG GTT ACC AAG CTC CCC TTG GCC GTG ATG GGA AGC TCC Leu Tyr Asp Val Val Thr Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly Ser Ser 180 185 190	576	
TAC GGA TTC CAA TAC TCA CCA GGA CAG CGG GTT GAA TTC CTC GTG CAA Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Gln 195 200 205	624	40

GCG TGG AAG TCC AAG AAA ACC CCA ATG GGG TTC TCG TAT GAT ACC CGC Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg 210 215 220	672	
TGC TTT GAC TCC ACA GTC ACT GAG AGC GAC ATC CGT ACG GAG GAG GCA Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ala 225 230 235 240	720	
ATC TAC CAA TGT TGT GAC CTC GAC CCC CAA GCC CGC GTG GCC ATC AAG Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala Ile Lys 245 250 255	768	10
TCC CTC ACC GAG AGG CTT TAT GTT GGG GGC CCT CTT ACC AAT TCA AGG Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Arg 260 265 270	816	
GGG GAG AAC TGC GGC TAT CGC AGG TGC CGC GCG AGC GGC GTA CTG ACA Gly Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr 275 280 285	864	
ACT AGC TGC GGT AAC ACC CTC ACT TGC TAC ATC AAG GCC CGG GCA GCC Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg Ala Ala 290 295 300	912	20
TGT CGA GCC GCA GGG CTC CAG GAC TGC ACC ATG CTC GTG TGT GGC GAC Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp 305 310 315 320	960	
GAC TTA GTC GTT ATC TGT GAA AGC GCG GGG GTC CAG GAG GAC GCG GCG Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp Ala Ala 325 330 335	1008	30
AGC CTG AGA GCC TTC ACG GAG GCT ATG ACC AGG TAC TCC GCC CCC CCC Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro 340 345 350	1056	
GGG GAC CCC CCA CAA CCA GAA TAC GAC TTG GAG CTC ATA ACA TCA TGC Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys 355 360 365	1104	
TCC TCC AAC GTG TCA GTC GCC CAC GAC GGC GCT GGA AAG AGG GTC TAC Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val Tyr 370 375 380	1152	40

TAC CTC ACC CGT GAC CCT ACA ACC CCC CTC GCG AGA GCT GCG TGG GAG Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu 385 390 395 400	1200	
ACA GCA AGA CAC ACT CCA GTC AAT TCC TGG CTA GGC AAC ATA ATC ATG Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met 405 410 415	1248	
TTT GCC CCC ACA CTG TGG GCG AGG ATG ATA CTG ATG ACC CAT TTC TTT Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe 420 425 430	1296	10
AGC GTC CTT ATA GCC AGG GAC CAG CTT GAA CAG GCC CTC GAT TGC GAG Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp Cys Glu 435 440 445	1344	
ATC TAC GGG GCC TGC TAC TCC ATA GAA CCA CTT GAT CTA CCT CCA ATC Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Pro Ile 450 455 460	1392	
ATT CAA AGA CTC CAT GGC CTC AGC GCA TTT TCA CTC CAC AGT TAC TCT Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser 465 470 475 480	1440	20
CCA GGT GAA ATT AAT AGG GTG GCC GCA TGC CTC AGA AAA CTT GGG GTA Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val 485 490 495	1488	
CCG CCC TTG CGA GCT TGG AGA CAC CGG GCC CGG AGC GTC CGC GCT AGG Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg 500 505 510	1536	30
CTT CTG GCC AGA GGA GGC AGG GCT GCC ATA TGT GGC AAG TAC CTC TTC Leu Leu Ala Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe 515 520 525	1584	
AAC TGG GCA GTA AGA ACA AAG CTC AAA CTC ACT CCA ATA GCG GCC GCT Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala Ala Ala 530 535 540	1632	
GGC CAG CTG GAC TTG TCC GGC TGG TTC ACG GCT GGC TAC AGC GGG GGA Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser Gly Gly 545 550 555 560	1680	40

GAC ATT TAT CAC AGC GTG TCT CAT GCC CGG CCC CGC TGG ATC TGG TTT 1728
 Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile Trp Phe
 565 570 575

TGC CTA CTC CTG CTT GCT GCA GGG GTA GGC ATC TAC CTC CTC CCC AAC 1776
 Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn
 580 585 590

CGA TGA GGATCC 1788
 Arg *

10

(2) 配列番号 2 に関する情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 594 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列の記載 : 配列番号 2 :

Met Ala Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys
 1 5 10 15

20

Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu
 20 25 30

Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Cys
 35 40 45

Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Ser
 50 55 60

His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser Lys Val
 65 70 75 80

30

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

Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp Ala Ala	
325 330 335	
Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro	
340 345 350	
Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys	
355 360 365	
Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val Tyr	10
370 375 380	
Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu	
385 390 395 400	
Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met	
405 410 415	
Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe	20
420 425 430	
Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp Cys Glu	
435 440 445	
Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Pro Ile	
450 455 460	
Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser	
465 470 475 480	
Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val	30
485 490 495	
Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg	
500 505 510	
Leu Leu Ala Arg Gly Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe	
515 520 525	
Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala Ala Ala	40
530 535 540	
Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser Gly Gly	
545 550 555 560	
Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile Trp Phe	
565 570 575	
Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn	
580 585 590	
Arg *	50

(2) 配列番号 3 に関する情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 29塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 他の核酸

(A) 説明 : /desc = 「オリゴヌクレオチドプライマー」

(iii) ハイボセチカル : No

(xi) 配列の記載 : 配列番号 3 :

ATAGCTAGCA TGTCTTACTC TTGGACAGG

10

29

(2) 配列番号 4 に関する情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 28塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : 他の核酸

(A) 説明 : /desc = 「オリゴヌクレオチドプライマー」

(iii) ハイボセチカル : No

(xi) 配列の記載 : 配列番号 4 :

ATAGGATCCT CATCGGTTGG GGAGGAGG

20

28

(2) 配列番号 5 に関する情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 5アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 該当なし

(D) トポロジー : 不明

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(iii) ハイボセチカル : No

(v) フラグメント型 : N-末端

(xi) 配列の記載 : 配列番号 5 :

Ala Ser Met Ser Tyr

1

5

30

(2) 配列番号 6 に関する情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 6アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 該当なし

(D) トポロジー : 不明

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(iii) ハイボセチカル : No

(v) フラグメント型 : N-末端

(xi) 配列の記載 : 配列番号 6 :

Met Ala Ser Met Ser Tyr

1

5

40

(2) 配列番号 7 に関する情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 4アミノ酸

50

(B) 型 : アミノ酸
 (C) 鎖の数 : 該当なし
 (D) トポロジー : 不明
 (ii) 配列の種類 : タンパク質
 (iii) ハイボセチカル : No
 (v) フラグメント型 : N-末端
 (xi) 配列の記載 : 配列番号 7 :

Ser Met Ser Tyr

1

(2) 配列番号 8 に関する情報 :

10

(i) 配列の特性 :
 (A) 長さ : 8 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (C) 鎖の数 : 該当なし
 (D) トポロジー : 不明
 (ii) 配列の種類 : ペプチド
 (iii) ハイボセチカル : Yes
 (xi) 配列の記載 : 配列番号 8 :

Ala Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr

1

5

20

(2) 配列番号 9 に関する情報 :

(i) 配列の特性 :
 (A) 長さ : 104 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 二本鎖
 (D) トポロジー : 該当なし
 (ii) 配列の種類 : 他の核酸
 (iii) ハイボセチカル : No
 (ix) 特徴 :
 (A) 特徴を表す記号 : CDS
 (B) 存在位置 : 63..104
 (xi) 配列の記載 : 配列番号 9 :

30

GGAGACCACA ACGGTTTCCC TCTAGAAATA ATTTTGTTTA ACTTTAAGAA GGAGATATAC

60

AT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGC GGA TCC

104

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser

1

5

10

(2) 配列番号 10 に関する情報 :

(i) 配列の特性 :
 (A) 長さ : 14 アミノ酸
 (B) 型 : アミノ酸
 (D) トポロジー : 直鎖状
 (ii) 配列の種類 : タンパク質
 (xi) 配列の記載 : 配列番号 10 :

40

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser

1

5

10

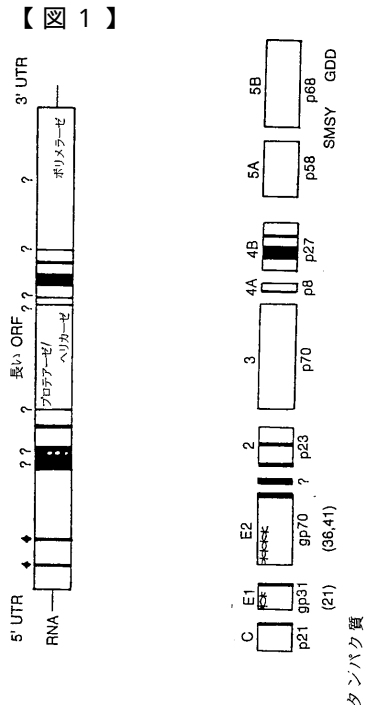


FIG. 1

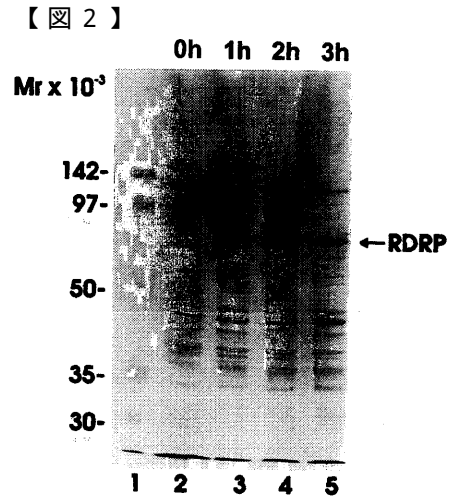


FIG. 2

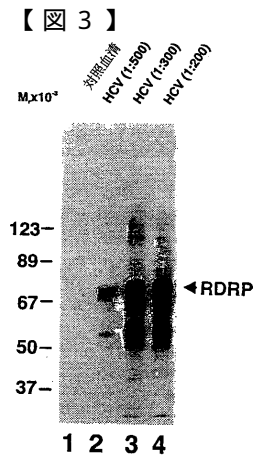


FIG. 3

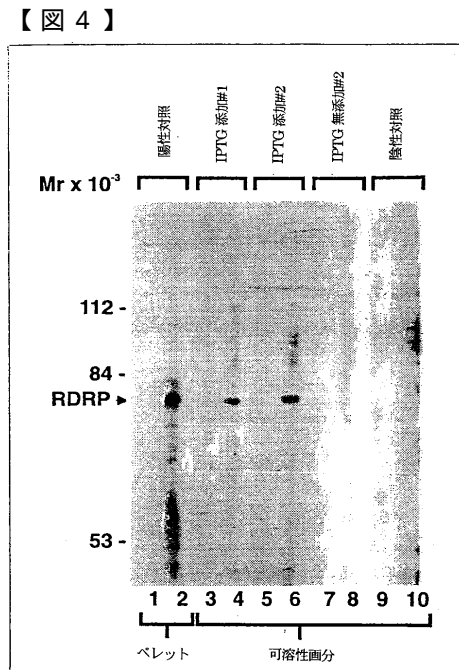


FIG. 4

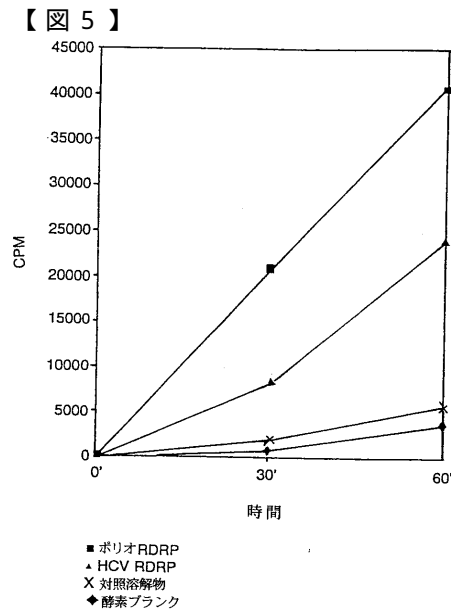


FIG. 5

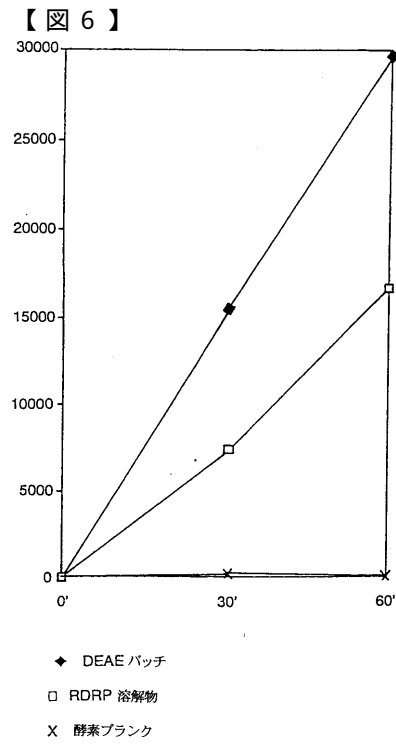


FIG. 6

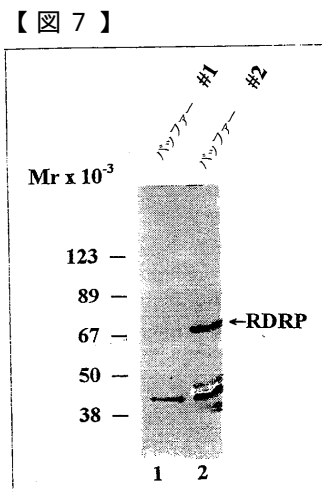


FIG. 7

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/576 (2006.01)		G 0 1 N 33/576	Z
C 1 2 R 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 R 1/91 (2006.01)		C 1 2 R 1:19	
		C 1 2 N 9/12	
		C 1 2 R 1:91	
		C 1 2 N 9/12	
		C 1 2 R 1:19	

(72)発明者 アル、レイノルダス エイチ．
アメリカ合衆国 3 0 3 2 9 ジョージア州 アトランタ ラヴィウスタ ロード エヌ．イー．
2 2 9 0 アpartment 7

審査官 山中 隆幸

(56)参考文献 特表平 1 0 - 5 0 7 3 7 0 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)