

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4777508号
(P4777508)

(45) 発行日 平成23年9月21日 (2011.9.21)

(24) 登録日 平成23年7月8日 (2011.7.8)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/11 (2006.01)

C O 7 K 14/11

C O 7 K 16/10 (2006.01)

C O 7 K 16/10

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

G O 1 N 33/569 (2006.01)

G O 1 N 33/569 L

請求項の数 8 外国語出願 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-316583 (P2000-316583)
 (22) 出願日 平成12年10月17日 (2000.10.17)
 (65) 公開番号 特開2001-211888 (P2001-211888A)
 (43) 公開日 平成13年8月7日 (2001.8.7)
 審査請求日 平成19年10月12日 (2007.10.12)
 (31) 優先権主張番号 99203401.7
 (32) 優先日 平成11年10月18日 (1999.10.18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 506196247
 インターベツト・インターナショナル・ベ
 ー・ペー
 オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツ
 クスメール、ウイム・ドウ・コルベルスト
 ラート・35
 (74) 復代理人 100161838
 弁理士 岡本 篤史
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 伝染性サケ貧血ウイルスの構造タンパク質-1 をコードする DNA およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1に示す核酸配列または配列番号3または4に示す配列からなるタンパク質をコードする該配列の断片を含んでなる核酸。

【請求項 2】

配列番号1の核酸配列を有する、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の核酸配列にコードされるタンパク質。

【請求項 4】

該タンパク質が、配列番号2、配列番号3または配列番号4に示すアミノ酸配列からなる、請求項 3 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

請求項 3 または 4 に記載のタンパク質に対して生じる抗体。

【請求項 6】

診断において使用するための、請求項 1 もしくは 2 に記載の核酸または請求項 3 もしくは 4 に記載のタンパク質または請求項 3 もしくは 4 に記載のタンパク質に対して生じる抗体。

【請求項 7】

請求項 1 もしくは 2 に記載の核酸または請求項 3 もしくは 4 に記載のタンパク質または請求項 3 もしくは 4 に記載のタンパク質に対して生じる抗体を含んでなる診断用組成物。

10

20

【請求項 8】

適当な検出手段と、請求項 1 もしくは 2 に記載の核酸または請求項 3 もしくは 4 に記載のタンパク質または請求項 3 もしくは 4 に記載のタンパク質に対して生じる抗体とを含んでなる診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸、および診断またはワクチンのための該核酸またはタンパク質の用途に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

伝染性サケ貧血 (ISA; Infectious Salmon Anaemia) は、オルトミクソウイルス (Orthomyxoviridae) 科に属するウイルス (ISAV) により引き起こされる疾患である。該疾患は、重篤な貧血、白血球減少、腹水、出血性肝臓壊死および内臓の点状出血により特徴づけられる。えらは青白くなり、皮膚の点状出血もよく見られる。脾臓は暗黒色になり、腫脹する (Speilbergら, 1995; Veterinary Pathology, 32, pp.466-478)。該ウイルスは血管および心臓の内皮細胞内ならびに多形核球内で複製される。えらの墜道細胞からの該ウイルスの出芽が観察されており、これは恐らく、えらが ISAV の進入の重要な入口であることを示すものであろう。

【0003】

ISA は、最初はノルウェーで見出され (Thorudら, 1988; Bull. Eur. Ass. Fish Pathol, 8(5), pp.109-111)、最近、スコットランド、シェトランド諸島およびカナダにおいても大発生が診断されている。発生中の死亡率は 10~100% と様々であり、老いた個体より若い個体の方が罹患しやすいようである。一方、市販サイズの魚類においても高い死亡率が認められている。これまでのところ、大西洋サケにおいて臨床的発生が認められているが、ニジマスおよびブラウントラウトが、臨床的徴候を現すことなく該因子のキャリアーとして働いている可能性がある。撲滅のための対策が講じられているにもかかわらず、新たな発生が定期的に生じており、著しい損害を与えている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

したがって、該疾患の制圧は高い優先順位を有し、本発明は、そのような制圧を行うための新規手段を提供する。本発明は、ISAV の構造タンパク質-1 (SP-1) と称される構造タンパク質および該タンパク質の断片をコードする核酸配列を提供する。該核酸は 1851 ヌクレオチドを含み、配列番号 1 に示されている。SP-1 の推定アミノ酸配列は配列番号 2 に示されている。本発明の核酸配列のクローニングおよび特徴づけは、組換え技術 (Sambrookら, Molecular cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) を用いた ISAV の SP-1 の製造をもたらす。インビトロ発現系を用いるクローニング技術およびそれに続くタンパク質発現は当技術分野においてよく知られている。このようにして、他の ISAV タンパク質を実質的に含有しない組換え SP-1 を得ることができる。SP-1 は ISA ウイルスに特異的であることが判明しており、このことは、このタンパク質をワクチン接種および診断における使用に非常に適したものにできる。この単離された SP-1 は、ISA ウイルスによる感染に対して魚類を防御するためのワクチンの製造において使用することができる。該ワクチンは、ISAV による野外感染からワクチン接種を識別するためのマーカーワクチンとして使用することができる。あるいは、SP-1 をコードするヌクレオチド配列は、ISAV による感染に対して魚類を防御するための DNA ワクチンまたはベクターワクチンの製造に使用することができる。さらに、本発明のヌクレオチド配列および組換えタンパク質は、診断目的に (例えば、魚類における ISAV または抗 ISAV 抗体の存在を検出するために) 使用することができる。また、本発明の組換え SP-1 は、ISAV 特異的抗体の製造に使用することができる。また、これらの抗体は、魚類における ISAV の検出などの診断目的に使用することができる。

【 0 0 0 5 】

【 発明の実施の形態 】

したがって、本発明は、第1の態様において、ISAVのSP-1タンパク質をコードする配列番号1に示す核酸配列および/または該ヌクレオチド配列の断片を含む核酸配列を提供する。配列番号1に記載の配列またはその断片の縦列配置を含むヌクレオチド配列も本発明の範囲内に含まれる。配列番号1に示す配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列、および配列番号1に示す配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列も本発明の範囲内に含まれる。この目的のためのハイブリダイゼーション条件は、ストリンジェント、好ましくは、高度にストリンジェントなものである。本発明においては、「ストリンジェント」なる語は65 の温度で1×SSC、0.1% SDSの洗浄条件を意味し、高度にストリンジェントな条件は0.3×SSCまでのSSC濃度の減少を意味する。

10

【 0 0 0 6 】

配列番号1に示す配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列は、配列番号1に示す配列の対応マッチ部分に対して少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%の配列相同性を有するヌクレオチド配列であると理解される。本発明においては、該配列相同性は、該ヌクレオチド配列を、配列番号1に示す配列の対応部分と比較することにより判定する。あるヌクレオチドと配列番号1中の配列との間の配列相同性は、BLASTNなどの一般的な配列分析プログラムにより判定することができる。これらのプログラムは最適なマッチ領域を自動的に決定する。通常のクローニングおよびハイブリダイゼーション技術（Sambrookら、前掲）を用いて、配列番号1に示す配列またはこの配列の断片で、密接に関連したISAV株から相同配列を容易に分離することができる。

20

【 0 0 0 7 】

本発明のヌクレオチド配列は、ISAウイルス感染に対して魚類をワクチン接種するためのDNAワクチンの製造において使用することができる。DNAワクチン接種は、DNAプラスミド（これは、ワクチン接種される魚類に直接的に接種される）内に挿入された遺伝子からインビボで発現された1以上の抗原に対する免疫応答の誘導を意味する。

【 0 0 0 8 】

したがって、本発明の第2の態様においては、本発明の1以上のヌクレオチド配列が転写調節配列に作動的に結合しているDNAプラスミドと医薬上許容される担体とを含んでなるDNAワクチンを提供する。

30

【 0 0 0 9 】

好ましくは、該DNAプラスミド内で使用するヌクレオチド配列は、配列番号1に示すヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列の断片を含むヌクレオチド配列である。より好ましくは、該DNAプラスミド内で使用するヌクレオチド配列は、配列番号1に示すヌクレオチド配列を有する。また、配列番号1の配列に相補的なヌクレオチド配列、または配列番号1の配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列も、該DNAプラスミド内での使用に適している。配列番号1の配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列間の配列相同性は、前記のとおりに判定される。

【 0 0 1 0 】

本発明のDNAワクチンの使用に適したDNAプラスミドは、細菌性、真核性および酵母宿主細胞のための通常のクローニングまたは発現プラスミドであり、それらの多くは商業的に入手可能である。そのようなプラスミドの良く知られた例としては、pBR322およびpcDNA3（Invitrogen）が挙げられる。本発明のDNAプラスミドは、該ヌクレオチド配列のタンパク質発現を誘導する能力を有すべきである。該DNAプラスミドは、本発明の1以上のヌクレオチド配列を含んでいてもよい。また、該DNAプラスミドは、非メチル化CpGジヌクレオチドを有する免疫刺激性オリゴヌクレオチド、または他の抗原性タンパク質またはアジュバント性サイトカインをコードするヌクレオチドなどの他のヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

40

【 0 0 1 1 】

本発明のDNAプラスミド内での使用に適した転写調節配列は、（ヒト）サイトメガロウイ

50

ルス前初期プロモーター (Seed, Bら, Nature 329, 840-842, 1987; Fynan, E.F.ら, PNAS 90, 11478-11482, 1993; Ulmerら, J.B.ら, Science 259, 1745-1748, 1993)、ラウス肉腫ウイルスLTR (RSV, Gorman, C.M.ら, PNAS 79, 6777-6781, 1982; Fynanら, 前掲; Ulmerら, 前掲)、MPSV LTR (Staceyら, J. Virology 50, 725-732, 1984)、SV40前初期プロモーター (Sprague J.ら, J. Virology 45, 773, 1983)、メタロチオネインプロモーター (Brinster, R.L.ら, Nature 296, 39-42, 1982)、Ad2の主要後期プロモーター、 β アクチンプロモーター (Tangら, Nature 356, 152-154, 1992)などのプロモーターを含む。また、該調節配列は、終結およびポリアデニル化配列を含んでもよい。使用しうる配列としては、よく知られたウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、SV40ポリアデニル化配列、ヒトサイトメガロウイルス (hCMV) 終結およびポリアデニル化配列が挙げられる。

10

【0012】

本発明のワクチンにおいて使用する転写調節配列に作動的に結合した本発明のヌクレオチド配列を含むDNAプラスミドは裸体であってもよく、あるいは運搬系内にパッケージングされていてもよい。適当な運搬系としては、脂質小胞、Iscoms、デンドロマー (dendromers)、ニオソーム、多糖マトリックスなどが挙げられる。サルモネラ (Salmonella) などの弱毒化生細菌も、運搬系として非常に適している。

【0013】

また、本発明のヌクレオチド配列は、ISAウイルス感染に対して魚類をワクチン接種するためのベクターワクチンの製造において使用することができる。ベクターワクチンは、生弱毒化細菌またはウイルスが修飾されていてその遺伝物質内に挿入された1以上の異種ヌクレオチド配列をそれが含有するようにされているワクチンであると理解される。これらのいわゆるベクター細菌またはウイルスは、該挿入ヌクレオチドにコードされる異種タンパク質を共発現しうる。

20

【0014】

したがって、本発明の第3の態様においては、本発明のヌクレオチド配列の1以上を遺伝物質内に含むように修飾されている生弱毒化細菌またはウイルスを含むベクターワクチンを提供する。

【0015】

好ましくは、該ベクターワクチンにおいて使用するヌクレオチド配列は、配列番号1に示すヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列の断片を含むヌクレオチド配列である。より好ましくは、ベクターワクチンにおいて使用するヌクレオチド配列は、配列番号1に示すヌクレオチド配列を有する。また、配列番号1の配列に相補的なヌクレオチド配列、または配列番号1の配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列も、該ベクターワクチンにおける使用に適している。配列番号1の配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列間の配列相同性は、前記のとおりに判定される。

30

【0016】

例えば、ワクシニアウイルスまたはセムリキ森林ウイルスが、ワクチンベクターとしての使用に非常に適している。

【0017】

第4の態様においては、本発明のヌクレオチド配列は、他のISAVタンパク質を実質的に含まない構造タンパク質-1の組換え製造に使用することができる。したがって、本発明は、本発明の核酸にコードされるSP-1タンパク質を提供する。より詳しくは、本発明は、配列番号2に示すアミノ酸配列および/または該アミノ酸配列の誘導体を含むSP-1タンパク質を提供する。

40

【0018】

配列番号2に示す配列の誘導体であるアミノ酸配列を含むSP-1タンパク質は、SP-1の抗原性または免疫原性に影響を及ぼさない配列番号2に示すアミノ酸配列に対するアミノ酸配列の改変を有するタンパク質であると理解される。

【0019】

50

本発明の目的においては、SP-1タンパク質の抗原性は、ISAウイルスを認識しそれと（交差）反応する抗体の産生を誘導する能力であると理解される。免疫原性は、ISAウイルスによる感染に対して防御する免疫応答を魚類において誘導する能力であると理解される。

【0020】

本発明の配列内に見出されうる改変は、例えば、全配列内のアミノ酸の同類アミノ酸置換、欠失、挿入、逆位または付加から生じうるであろう。免疫学的特性を改変しないと予想されるアミノ酸置換は既に記載されている。関連アミノ酸間でのアミノ酸置換、または進化において頻繁に生じている置換としては、とりわけ、Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Valが挙げられる（Dayfor, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found, Washington D.C., 1978, vol.5, suppl.3）。この情報に基づき、LipmanおよびPearsonは、タンパク質の比較（Science, 1985, vol.227, 1435-1441）ならびに配列相同性を有するタンパク質およびペプチドの間の機能的類似性の判定のための迅速かつ高感度な方法を開発した。

【0021】

本発明の誘導体タンパク質は、天然SP-1として機能する能力、および/またはISAウイルスを認識しそれと（交差）反応する抗体の産生を誘導する能力を尚も有する。本発明の他の誘導体としては、ISAウイルスを認識しそれと（交差）反応する抗体の産生を誘導する能力、またはISAウイルスによる感染に対して防御する免疫応答を魚類において誘導する能力を尚も有するタンパク質断片が挙げられる。好ましくは、本発明のタンパク質は、配列番号2に示すアミノ酸配列またはその断片を有する。本発明の適当な断片は、アミノ酸配列SRPKRSDYRKQGQSKC（配列番号3）またはCIEFDEDDQEEEDTDI（配列番号4）を有する。

【0022】

本発明のタンパク質は、標準的な組換えタンパク質発現技術により製造することができる。この目的には、SP-1、SP-1の誘導体タンパク質またはSP-1の多量体をコードする本発明のヌクレオチド配列を発現ベクター内に挿入する。好ましくは、該ヌクレオチド配列は、配列番号1に示すヌクレオチド配列またはその1以上の断片を含む。また、配列番号1の配列に相補的なヌクレオチド配列、または配列番号1に示す配列に対する配列相同性が少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%であるヌクレオチド配列も適している。該DNAプラスミドにおける使用に適したヌクレオチド配列間の配列相同性は、前記のとおり判定される。

【0023】

適当な発現ベクターとしては、とりわけ、複製および発現に必要な制御領域を含むプラスミド、コスミド、ウイルスおよびYAC（酵母人工染色体）が挙げられる。該発現ベクターは宿主細胞内での発現を引き起こしうる。適当な宿主細胞には、細菌、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳類細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような発現技術は当技術分野でよく知られている（Sambrookeら, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989）。発現後、発現されたタンパク質を培地から単離し精製することができる。

【0024】

もう1つの態様において、本発明は、本発明のタンパク質と医薬上許容される担体とを含むワクチンを提供する。より詳しくは、本発明のワクチンは、配列番号2に示すアミノ酸配列および/または該アミノ酸配列の誘導体を含むタンパク質を含む。好ましくは、本発明のワクチンは、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号3もしくは4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質断片を含む。

【0025】

本発明のワクチンは、当業者によく知られた技術に従い製造することができる。本発明のワクチンは、本発明の免疫原の有効量と医薬上許容される担体とを含む。本発明で用いる「有効」なる語は、標的魚類において免疫応答を誘導するのに十分な量と定義される。本発明の免疫原は、本発明の1以上のヌクレオチド配列が転写調節配列に作動的に結合したDNAプラスミド、本発明の1以上の核酸を含むワクチンベクター、または本発明のタンパク

10

20

30

40

50

質を含む。プラスミド、ベクターまたはタンパク質の量は、プラスミドまたはベクターのタイプ、投与経路、投与時間、魚類の種ならびに年齢、全身的健康状態および食餌に左右されるであろう。

【0026】

一般に、体重1kg当たりタンパク質0.01~1000 μg 、好ましくは0.5~500 μg 、より好ましくは0.1~100 μg の投与量を用いることができる。該DNAワクチンに関しては、一般に、1000 μg までの投与量で10pgの最少投与量が該抗原のインビボでの適当な発現に十分であることが示されている。

【0027】

本発明のワクチンにおける使用に適した医薬上許容される担体としては、無菌水、食塩水、水性バッファー、例えばPBSなどが挙げられる。また、本発明のワクチンは、他の添加物、例えばアジュバント、安定化剤、抗酸化剤などを含んでいてもよい。

【0028】

適当なアジュバントには、とりわけ、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、アンフィゲン (amphigen)、トコフェノール、モノホスフェニルリピドA、ムラミルジペプチド、油エマルション、グルカン、サイトカインおよびサポニン、例えばQuil Aが含まれる。加えるアジュバントの量は、該アジュバント自体の性質に左右される。

【0029】

本発明のワクチンに使用するための適当な安定化剤としては、例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ショ糖、デキストリンおよびグルコースを含む炭水化物、アルブミンまたはカゼインなどのタンパク質、リン酸アルカリなどのバッファーが挙げられる。

【0030】

本発明のワクチンは、注射、噴霧、液浸により又は経口的に魚類に投与される。投与プロトコールは、標準的なワクチン接種プラクティスに従い最適化されうる。

【0031】

本発明のヌクレオチド配列およびタンパク質は、診断における用途にも適している。該ヌクレオチド配列またはその断片は、魚類におけるISAVの存在を検出するために使用することができる。ISAVに感染した魚類のサンプルは、該ウイルスに由来する核酸物質（本発明のタンパク質をコードする核酸配列を含む）を含むであろう。本発明の核酸配列に対して反応性の核酸配列の検出のための適当な方法は、PCR技術およびNASBA技術を含む（これらに限定されるものではない）ハイブリダイゼーション技術を含む。

【0032】

本発明のヌクレオチド配列の断片は、ISAV特異的ヌクレオチド配列の検出のためのプライマーまたはプローブとして使用することができる。プライマーとしての使用に適したものとなるためには、本発明の断片は、本発明のヌクレオチド配列の少なくとも18個の連続したヌクレオチド、より好ましくは、25個の連続したヌクレオチドを構成すべきである。そのような適当な断片の具体例としては、フォワードプライマーとしての5'-CAG GTG GGA GTG GCA TGG-3'（配列番号5）およびリバースプライマーとしての5'-AGA CTT GGC TCC TTC CGG TG-3'（配列番号6）が挙げられる。ISAウイルスの存在を検出するためのノーザンまたはサザンブロット技術において使用するためのプローブを得るために、本発明のプライマーを使用することができる。この目的には、プローブは、本発明のヌクレオチド配列の少なくとも100個、より好ましくは、少なくとも200個の連続したヌクレオチド残基を含有すべきである。PCRにより626ヌクレオチドのプローブを得るために、配列番号5および6のヌクレオチド配列を有するプライマーペアを使用した。このプローブは、ISAウイルスのSP-1遺伝子の626個の連続したヌクレオチドに類似しており、ISAVに由来するSP-1 RNAに特異的にハイブリダイズする。本発明のプライマーおよびプローブは、標準的な遺伝子工学技術を用いて製造することができる。配列番号1に示すヌクレオチド配列はISAウイルスに特異的であり、したがってこのヌクレオチド配列に基づくプライマーおよびプローブは、ISAウイルスからのRNAまたはDNA配列を特異的に検出するであろう。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明のタンパク質は、魚類における抗SP-1抗体の存在を検出するために使用することができる。SP-1はISAウイルスに特徴的なものであるため、魚類におけるSP-1に対する抗体の存在はISAウイルスによる感染の指標となる。一般に、これらの抗体は、

(i) ISAVに対する抗体を含有すると疑われるサンプルをSP-1抗原と共にインキュベートし、

(ii) 抗体-抗原複合体を形成させ、

(iii) 該抗体-抗原複合体の存在を検出する工程を含むイムノアッセイにより検出することができる。

【0034】

このイムノアッセイの設計は様々となりうる。例えば、該イムノアッセイは競合または直接的反応に基づくものであってもよい。さらに、プロトコールは固体支持体または細胞物質を用いるものであってもよい。該抗体-抗原複合体の検出は標識抗体の使用を含むものであってもよい。該標識は、例えば、酵素、蛍光、化学発光、放射性または色素分子であってもよい。

【0035】

該サンプル中の本発明のタンパク質に対して反応性の抗体の検出のための適当な方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫蛍光試験(IFT)およびウエスタンブロット分析を含む。

【0036】

さらに、本発明のタンパク質は、当分野の当業者に利用可能な一般的な技術を用いて抗体を産生させるために使用することができる。本発明のタンパク質で産生される抗体は、ISAウイルスのSP-1と特異的に反応するという利点を有する。好ましくは、特異的モノクローナル抗体を産生させるために、該タンパク質を使用する。得られた抗体は、魚類におけるISAVの存在を検出するための診断に利用することができる。

【0037】

したがって、もう1つの態様において、本発明は、検出のための適当な手段と、本発明の1以上のヌクレオチド配列、または本発明の1以上のタンパク質、またはそれぞれ該タンパク質で得られた抗体とを含む診断用キットを提供する。

【0038】

本発明の抗体は標準的な技術に従い製造することができる。動物(例えば、マウス)をタンパク質で免疫するための方法、および免疫原特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択のための方法は、当技術分野でよく知られている(例えば、Coliganら編, Current protocols in Immunology, 1992; KohlerおよびMilstein, Nature 256:495-497, 1975; Steenbakkersら, Mol. Biol. Rep. 19:125-134, 1994)。該抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体である。

【0039】

以下の実施例は本発明を例示するものであり、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【0040】

【実施例】

材料および方法

ウイルスの分離およびcDNAライブラリーの構築

ブレムネス(Bremnes)(ノルウェー)における1998年のISAの発生時に、腎臓サンプルを大西洋サケ(Salmo salar L.)から採取した。該サンプルをホモジナイズし、遠心分離により清澄化した後、濾過(0.2 μ m)した。該ホモジネートをリン酸緩衝食塩水中で1:100に希釈し、細胞培養フラスコ内でASK(大西洋サケ腎臓)細胞の単層と共に15で3時間インキュベートした。ついで該接種物を細胞培養培地(5% FCS、50 μ g ml⁻¹ゲンタマイシンおよび4mM L-グルタミンで補足されたL-15)で置換し、該培養を15でインキュベートした。Trizol試薬(Life Technologies)を使用して、ISAV感染ASK細胞からRNAを単離した。細胞にISAVを感染させ、感染の2、3および4日後に全RNAを単離した。該RNAをプール

10

20

30

40

50

し、2 µgをcDNA Synthesis Kit (Stratagene) でのcDNA合成に使用した。ついでUni-ZAP XRベクターおよびGigapack III Goldパッケージング・エキストラクト (Stratagene) を使用して、一方向バクテリオファージラムダcDNAライブラリーを構築した。

【0041】

バクテリオファージラムダcDNAライブラリーのスクリーニング

picoBlue Immunoscreening Kit (Stratagene) を使用するポリクローナル抗ISAVウサギ血清 (後記を参照されたい) での免疫スクリーニングにより、SP-1を同定した。ベクタープライマーを使用して、ISAVに由来すると疑われるクローンからのPCR産物を得、該産物を配列決定した。各配列ごとに1組の内部PCRプライマーを構築し、このプライマーペアをISAV感染細胞および非感染細胞からのcDNA上で使用して、該配列がウイルス性であるか否かを判定した。ついでExAssistヘルパーファージおよび大腸菌 (E. coli) のSOLR株 (Stratagene) を使用して、pBlueScriptプラスミドをISAV陽性クローンから切り出した。単離されたプラスミド上で、完全な配列決定を行った。完全長cDNA配列を得るために、5' RACE System, Version 2.0 (Life Technologies) で5' RACEを行った。RACE産物を、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を使用してpCR2.1-TOPOベクター内にクローニングし、後記のとおり配列決定した。

10

【0042】

DNAの配列決定および合体

プラスミドおよびPCR産物を、BigDye Terminator Sequencing KitおよびABI 377 DNAアナライザー (PE Biosystems) を使用して配列決定した。Sequencherソフトウェア (Gene Codes Corporation) で配列を合体させた。GeneBank検索をBLAST (2.0) で行った。

20

【0043】

抗血清の調製

ISAVビリオンを、Mjaalandら, J. Virol. 71. p.7681-7686, 1997に記載のとおり連続ショ糖勾配上で精製した。各免疫当たり約50 µgの精製ISAVを使用してウサギを6週間隔で3回免疫することにより、ポリクローナル抗血清を調製した。第1および第2免疫は、それぞれフロイント完全およびフロイント不完全アジュバント (Difco) 中、皮下に行った。第3免疫は、食塩水中、静脈内に行った。第3免疫の10日後に該動物から採血した。キーホールリンペットヘモシアニンと共役したペプチドSRPKRSDYRKGQGSKC (配列番号3) およびCIEFDEDDQEEEDTDI (配列番号4) を使用して、Eurogentec (Belgium) により推定SP-1タンパク質に対するペプチド抗血清が調製された。該共役ペプチドをブールし、Eurogentecの方法に従い2匹のウサギに注射した。

30

【0044】

ノーザンブロット分析

Northern Max Kit (Ambion) でノーザンブロッティングを行った。簡単に説明すると、ISAV感染ASK細胞 (感染の3日後) または非感染細胞からの約15 µgの全RNAを、ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動により分離し、Hybond Nナイロンメンブレン (Amersham Pharmacia Biotech) 上にブロットした。DIG High Prime Labelling and Detection Starter Kit 2 (Boehringer Mannheim) に従いプローブを調製し使用した。DIG標識RNA分子量マーカー (Boehringer Mannheim) を同時に移動させた。

40

【0045】

SP-1 cDNAのバキュロウイルス発現

SP-1 cDNAを、プライマー5'-cgggatccatggccgataaaggtatgac-3' (配列番号7) および5'-gggtacctgcagtttcaaagtgcagtgac-3' (配列番号8) を使用して増幅し、pFastBac1 (Life Technologies) のBam HIおよびKpn I部位内にクローニングした。該構築物をTOP 10細胞 (Invitrogen) 内に形質転換し、単離されたプラスミドを使用してDH10Bacコンピテント細胞 (Life Technologies) を形質転換した。組換えバキュロウイルスをLife Technologiesの推奨に従い構築した。

【0046】

Sf9細胞上の免疫蛍光

50

SP-1組換え又は非組換えバキュロウイルスに感染したSf9細胞をマイクロタイタープレート内で28℃で増殖させた。感染の5日後、該細胞を96%エタノール中で固定し、風乾した。細胞を該ポリクローナルウサギ抗血清と共に37℃で1時間インキュベートした。PBSで洗浄した後、フルオレセインイソチオシアナート共役ヤギαウサギIgG (KPL)を加え、細胞を37℃で1時間インキュベートした。洗浄後、該細胞をグリセロール-食塩水でマウントし、紫外線顕微鏡を使用して検査した。

【0047】

SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティング

精製ISAVまたはSf9細胞のライセートを不連続SDS-PAGEゲル(4%濃縮用ゲルおよび12%分離ゲル)上、200Vで40分間分離した。タンパク質を、100Vで60分間の電気泳動によりニトロセルロース上にブロッティングした。ブロッティングおよび洗浄の後、該メンブレンをペプチド血清(1:X希釈物)またはポリクローナル抗血清(1:X希釈物)と共に、ついでペルオキシダーゼ共役ヤギαIgG血清(BioRad)(1:X希釈物)と共にインキュベートした。

【0048】

ELISA

ISAV感染および非感染(対照)SHK細胞のライセートを炭酸塩-炭酸水素塩バッファー(15 mM Na₂CO₃、35mM NaHCO₃、pH9.6)中で5 μg ml⁻¹の総タンパク質濃度にまで希釈した。マイクロタイタープレート(96ウェル、Nunc)を100 μl/ウェルで4℃で一晩コーティングし、0.1% Tween-20 (PBS-Tween)を含有するリン酸緩衝食塩水(0.1M、pH7.2)で5回洗浄した。該プレートをPBS-Tween中の5%脱脂乾燥乳で20℃で1時間、後コーティング(post-coated)(150 μl)し、PBS-Tweenで5回洗浄した。後続のすべてのインキュベーションは、0.5%脱脂乾燥乳を含有するPBS-Tween中で行った。血清サンプル(100 μl)の系列希釈物を4℃で一晩インキュベートし、ついでPBS-Tweenで5回洗浄した。100 μlのホースラディッシュペルオキシダーゼ共役ヤギ抗ウサギ血清(Amersham)(1:2000希釈物)を20℃で45分間インキュベートした。PBS-Tweenで3回およびPBSで2回洗浄した後、100 μlのo-フェニレンジアミン二塩酸塩(OPD, Sigma)溶液(リン酸クエン酸バッファー(pH5.0)中の0.4mg/ml OPD)を使用して、該結合を可視化した。20分後に、100 μlの2.3M H₂SO₄を加えることにより該反応を停止した。4℃で30分間平衡化した後、Titertec Multiscan SSC分光光度計により該プレートを492nmで読取った。

【0049】

ワクチン接種

SP-1組換えバキュロウイルスに感染したSf9細胞のライセートを非鉱油中で乳化し、大西洋サケ(Salmo salar)の前二年子サケ(presmolts)に注射した。対照の魚には食塩水を、又は有効であることが予め示されている不活化ISAVに基づくワクチンを注射した。該魚を個々のタンク内に維持し、ワクチン接種の10週間後にISAV Bremnes 98の腹腔内注射により攻撃した。

【0050】

結果および結論

ISAV cDNAのクローニングおよび配列決定

全ウイルスに対して調製したポリクローナル血清でのバクテリオファージラムダcDNAライブラリーの免疫スクリーニングにより、1851塩基のオープンリーディングフレーム(ORF)を有する、考えられうるISAVクローンが同定された。該クローンを、仮にSP-1と命名した。該SP-1 ORFは、68.1kDaの推定分子量を有するタンパク質をコードする。SP-1特異的PCRプライマーは、ISAV感染ASK細胞からの産物を増幅し、非感染細胞からの産物は増幅しなかった。また、同じプライマーを使用して調製したDIG標識SP-1特異的DNAプローブは、ISAV感染ASK細胞からの全RNAにはハイブリダイズしたが、非感染細胞からのRNAにはハイブリダイズしなかった。これは、SP-1配列がISAV由来であり細胞由来ではないことを明らかに示している。また、SP-1配列に相補的なプライマーおよびプローブはISAに関する診断手段として有用である。

【0051】

SP-1の発現および遺伝子産物の同定

バキュロウイルス感染Sf9細胞内でのSP-1 cDNAの発現は、全ウイルスに対して調製されたポリクローナル抗血清および該ペプチド血清とウエスタンブロッティングにおいて反応する約70kDaの分子量を有するタンパク質を与えた。インサートを有さないバキュロウイルスに感染したSf9細胞のライセートは陰性であった。該ポリクローナル血清は、精製されたウイルス中の同様のタンパク質とも反応した。該ポリクローナル抗血清および該ペプチド血清はまた、IFATにおいて、SP-1組換えバキュロウイルスに感染したSf9細胞とは反応したが、空バキュロウイルスに感染した細胞とは反応しなかった。これらの結果は、ウイルスタンパク質がバキュロウイルス系において発現されること、および特定されているSP-1ペプチドに対して産生したウサギ抗血清がISAVの存在の検出に有用であることを示している。

10

【 0 0 5 2 】

バキュロウイルス発現SP-1タンパク質に対するウサギにおける免疫応答の検出バキュロウイルス発現SP-1タンパク質（図1）またはSP-1対応ペプチド（キーホールリンペットヘモシアニンとの共役体）（図2および3）でのウサギの免疫は、免疫応答およびISAV反応性抗体の産生を誘導した。バキュロウイルス発現SP-1タンパク質の注射後の応答は、全ウイルスで免疫したウサギにおいて得られた応答に匹敵するものであった（図4）。これらの結果は、バキュロウイルス発現SP-1タンパク質、または該SP-1配列からの合成ペプチドが、ウサギにおいて免疫原性であり、野生型ISAVに対する免疫応答を誘導することを示している。得られた抗血清は診断手段として有用である。さらに、これらの結果は、該SP-1タン

20

【 0 0 5 3 】

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Akzo Nobel NV

<120> DNA encoding Structural Protein-1 of Infectious Salmon
Anaemia Virus and uses thereof

<130> I/99494 JP

<140>

<141>

10

<150> EP99203401.7

<151> 1999-10-18

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1851

<212> DNA

<213> INFECTIOUS SALMON ANAEMIA VIRUS

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1851)

<400> 1

atg gcc gat aaa ggt atg act tat tct ttt gat gtc aga gac aac acc 48
Met Ala Asp Lys Gly Met Thr Tyr Ser Phe Asp Val Arg Asp Asn Thr
1 5 10 15

30

ttg gtt gta aga aga tct acc gct act aaa agt ggt ata aag atc tcc 96
Leu Val Val Arg Arg Ser Thr Ala Thr Lys Ser Gly Ile Lys Ile Ser
20 25 30

tac aga gaa gat aga ggt act tca ctt ctc caa aag gcc ttt gcg ggg 144
Tyr Arg Glu Asp Arg Gly Thr Ser Leu Leu Gln Lys Ala Phe Ala Gly
35 40 45

aca gat gat gaa ttc tgg ctg gag ctg gat caa gac gtg tac gta gac 192
Thr Asp Asp Glu Phe Trp Leu Glu Leu Asp Gln Asp Val Tyr Val Asp
50 55 60

40

aag agg att aga aag ttc ctt gag gaa gag aag atg aag gac atg agc 240
Lys Arg Ile Arg Lys Phe Leu Glu Glu Glu Lys Met Lys Asp Met Ser
65 70 75 80

ccc aga gtg tct ggt tct gtt gct gca gca atc gaa agg tca gtg gag	288	
Pro Arg Val Ser Gly Ser Val Ala Ala Ala Ile Glu Arg Ser Val Glu		
85 90 95		
ttc gac aac ttt tca aag gaa gca gct gcg aac atc gag atg tca gga	336	
Phe Asp Asn Phe Ser Lys Glu Ala Ala Ala Asn Ile Glu Met Ser Gly		
100 105 110		
gag gac gag gaa gaa gca ggt ggg agt ggc atg gtt gac aac aag agg	384	
Glu Asp Glu Glu Glu Ala Gly Gly Ser Gly Met Val Asp Asn Lys Arg		10
115 120 125		
agg aac aaa ggg gtc tcc aac atg gcg tac aac ctt tca ctg ttc att	432	
Arg Asn Lys Gly Val Ser Asn Met Ala Tyr Asn Leu Ser Leu Phe Ile		
130 135 140		
gga atg gtc ttc cct gca atc acc acg ttc ttc agc gca atc ctg tca	480	
Gly Met Val Phe Pro Ala Ile Thr Thr Phe Phe Ser Ala Ile Leu Ser		
145 150 155 160		
gaa ggt gaa atg agc atc tgg caa aac ggg cag gca atc atg agg att	528	20
Glu Gly Glu Met Ser Ile Trp Gln Asn Gly Gln Ala Ile Met Arg Ile		
165 170 175		
ctc gct ttg gct gat gaa gac gga aag agg caa acg aga aca ggc gga	576	
Leu Ala Leu Ala Asp Glu Asp Gly Lys Arg Gln Thr Arg Thr Gly Gly		
180 185 190		
cag aga gtg gac atg gca gat gtt acc aag cta aac gtg gtg aca gca	624	
Gln Arg Val Asp Met Ala Asp Val Thr Lys Leu Asn Val Val Thr Ala		30
195 200 205		
aac ggg aaa gtc aag cag gtt gaa gtc aat ttg aat gac ctg aag gca	672	
Asn Gly Lys Val Lys Gln Val Glu Val Asn Leu Asn Asp Leu Lys Ala		
210 215 220		
gct ttc aga cag agc aga ccc aaa agg tca gac tac agg aaa gga caa	720	
Ala Phe Arg Gln Ser Arg Pro Lys Arg Ser Asp Tyr Arg Lys Gly Gln		
225 230 235 240		
gga tca aag gca act gaa tca agt att tcc aac cag tgc atg gct ctg	768	40
Gly Ser Lys Ala Thr Glu Ser Ser Ile Ser Asn Gln Cys Met Ala Leu		
245 250 255		
att atg aag tca gtg ttg tca gca gac cag ctg ttt gca cca ggt gtg	816	
Ile Met Lys Ser Val Leu Ser Ala Asp Gln Leu Phe Ala Pro Gly Val		
260 265 270		

aag atg atg agg acc aat ggt ttc aac gca tca tac act aca cta gca	864	
Lys Met Met Arg Thr Asn Gly Phe Asn Ala Ser Tyr Thr Thr Leu Ala		
275 280 285		
gaa gga gcc aac att cca agc aag tac cta agg cac atg agg aac tgc	912	
Glu Gly Ala Asn Ile Pro Ser Lys Tyr Leu Arg His Met Arg Asn Cys		
290 295 300		
gga gga gtt gct cta gat ctt atg gga atg aag agg atc aag aat tca	960	
Gly Gly Val Ala Leu Asp Leu Met Gly Met Lys Arg Ile Lys Asn Ser		10
305 310 315 320		
ccg gaa gga gcc aag tct aag atc ttt tct atc atc cag aag aaa gtc	1008	
Pro Glu Gly Ala Lys Ser Lys Ile Phe Ser Ile Ile Gln Lys Lys Val		
325 330 335		
agg gga agg tgt cgc act gag gag caa cgg ctg ctg act agt gca ttg	1056	
Arg Gly Arg Cys Arg Thr Glu Glu Gln Arg Leu Leu Thr Ser Ala Leu		
340 345 350		
aag atc agt gat ggc gag aac aag ttc caa agg atc atg gac act ctg	1104	20
Lys Ile Ser Asp Gly Glu Asn Lys Phe Gln Arg Ile Met Asp Thr Leu		
355 360 365		
tgc aca agc ttt ctg att gac cca cct aga aca acc aaa tgc ttc att	1152	
Cys Thr Ser Phe Leu Ile Asp Pro Pro Arg Thr Thr Lys Cys Phe Ile		
370 375 380		
cca cct atc tcc agt ctc ttg acg tac att cag gac gga aat tca gtg	1200	
Pro Pro Ile Ser Ser Leu Leu Thr Tyr Ile Gln Asp Gly Asn Ser Val		
385 390 395 400		30
ttg gca atg gac ttc atg aag aac gga gaa gat gct tgc agg atc tgc	1248	
Leu Ala Met Asp Phe Met Lys Asn Gly Glu Asp Ala Cys Arg Ile Cys		
405 410 415		
aga gag gca aag ctg aag gtt gga gtg aac ggc aca ttc aca atg tct	1296	
Arg Glu Ala Lys Leu Lys Val Gly Val Asn Gly Thr Phe Thr Met Ser		
420 425 430		
gtg gct aga aca tgt gta gct gtg tca atg gtt gca aca gca ttc tgt	1344	
Val Ala Arg Thr Cys Val Ala Val Ser Met Val Ala Thr Ala Phe Cys		40
435 440 445		
tca gca gac atc atc gag aat gca gtt cct ggc tgc gaa agg tac agg	1392	
Ser Ala Asp Ile Ile Glu Asn Ala Val Pro Gly Ser Glu Arg Tyr Arg		
450 455 460		

tca aac atc aag gca aac aca acc aaa ccc aag aag gac tca aca tac 1440
Ser Asn Ile Lys Ala Asn Thr Thr Lys Pro Lys Lys Asp Ser Thr Tyr
465 470 475 480

aca atc caa ggg ctg agg ctg tcc aat gtg aag tac gag gca aga cct 1488
Thr Ile Gln Gly Leu Arg Leu Ser Asn Val Lys Tyr Glu Ala Arg Pro
485 490 495

gaa aca tct caa agc aac aca gat cga agc tgg caa gta aat gtc aca 1536
Glu Thr Ser Gln Ser Asn Thr Asp Arg Ser Trp Gln Val Asn Val Thr
500 505 510

gac agt ttc gga ggg cta gcg gtt ttc aac caa ggc gct atc agg gag 1584
Asp Ser Phe Gly Gly Leu Ala Val Phe Asn Gln Gly Ala Ile Arg Glu
515 520 525

atg ctt gga gat gga aca tct gag aca aca agt gtg aat gtc agg gct 1632
Met Leu Gly Asp Gly Thr Ser Glu Thr Thr Ser Val Asn Val Arg Ala
530 535 540

ctg gta aag agg atc ttg aag tct gct tca gaa aga agc gca aga gct 1680
Leu Val Lys Arg Ile Leu Lys Ser Ala Ser Glu Arg Ser Ala Arg Ala
545 550 555 560

gta aag aca ttc atg gtt gga gaa caa ggg aag tct gca att gtt atc 1728
Val Lys Thr Phe Met Val Gly Glu Gln Gly Lys Ser Ala Ile Val Ile
565 570 575

tca gga gtg ggg ctt ttc tct att gac ttt gaa ggg gtt gag gag gca 1776
Ser Gly Val Gly Leu Phe Ser Ile Asp Phe Glu Gly Val Glu Glu Ala
580 585 590

gag agg atc act gac atg aca cct gac atc gag ttc gat gag gac gat 1824
Glu Arg Ile Thr Asp Met Thr Pro Asp Ile Glu Phe Asp Glu Asp Asp
595 600 605

cag gag gag gaa gac act gac att tga 1851
Gln Glu Glu Glu Asp Thr Asp Ile
610 615

<210> 2

<211> 616

<212> PRT

<213> INFECTIUOS SALMON ANAEMIA VIRUS

<400> 2

10

20

30

40

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

10

20

30

40

Ile Met Lys Ser Val Leu Ser Ala Asp Gln Leu Phe Ala Pro Gly Val	
260 265 270	
Lys Met Met Arg Thr Asn Gly Phe Asn Ala Ser Tyr Thr Thr Leu Ala	
275 280 285	
Glu Gly Ala Asn Ile Pro Ser Lys Tyr Leu Arg His Met Arg Asn Cys	
290 295 300	
Gly Gly Val Ala Leu Asp Leu Met Gly Met Lys Arg Ile Lys Asn Ser	10
305 310 315 320	
Pro Glu Gly Ala Lys Ser Lys Ile Phe Ser Ile Ile Gln Lys Lys Val	
325 330 335	
Arg Gly Arg Cys Arg Thr Glu Glu Gln Arg Leu Leu Thr Ser Ala Leu	
340 345 350	
Lys Ile Ser Asp Gly Glu Asn Lys Phe Gln Arg Ile Met Asp Thr Leu	20
355 360 365	
Cys Thr Ser Phe Leu Ile Asp Pro Pro Arg Thr Thr Lys Cys Phe Ile	
370 375 380	
Pro Pro Ile Ser Ser Leu Leu Thr Tyr Ile Gln Asp Gly Asn Ser Val	
385 390 395 400	
Leu Ala Met Asp Phe Met Lys Asn Gly Glu Asp Ala Cys Arg Ile Cys	
405 410 415	
Arg Glu Ala Lys Leu Lys Val Gly Val Asn Gly Thr Phe Thr Met Ser	30
420 425 430	
Val Ala Arg Thr Cys Val Ala Val Ser Met Val Ala Thr Ala Phe Cys	
435 440 445	
Ser Ala Asp Ile Ile Glu Asn Ala Val Pro Gly Ser Glu Arg Tyr Arg	
450 455 460	
Ser Asn Ile Lys Ala Asn Thr Thr Lys Pro Lys Lys Asp Ser Thr Tyr	40
465 470 475 480	
Thr Ile Gln Gly Leu Arg Leu Ser Asn Val Lys Tyr Glu Ala Arg Pro	
485 490 495	
Glu Thr Ser Gln Ser Asn Thr Asp Arg Ser Trp Gln Val Asn Val Thr	
500 505 510	

Asp Ser Phe Gly Gly Leu Ala Val Phe Asn Gln Gly Ala Ile Arg Glu
 515 520 525

Met Leu Gly Asp Gly Thr Ser Glu Thr Thr Ser Val Asn Val Arg Ala
 530 535 540

Leu Val Lys Arg Ile Leu Lys Ser Ala Ser Glu Arg Ser Ala Arg Ala
 545 550 555 560

Val Lys Thr Phe Met Val Gly Glu Gln Gly Lys Ser Ala Ile Val Ile
 565 570 575

10

Ser Gly Val Gly Leu Phe Ser Ile Asp Phe Glu Gly Val Glu Glu Ala
 580 585 590

Glu Arg Ile Thr Asp Met Thr Pro Asp Ile Glu Phe Asp Glu Asp Asp
 595 600 605

Gln Glu Glu Glu Asp Thr Asp Ile
 610 615

20

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> INFECTIUOS SALMON ANAEMIA VIRUS

<400> 3

Ser Arg Pro Lys Arg Ser Asp Tyr Arg Lys Gly Gln Gly Ser Lys Cys
 1 5 10 15

30

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> INFECTIUOS SALMON ANAEMIA VIRUS

<400> 4

Cys Ile Glu Phe Asp Glu Asp Asp Gln Glu Glu Glu Asp Thr Asp Ile
 1 5 10 15

40

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> INFECTIUOS SALMON ANAEMIA VIRUS

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(18)

<400> 5

caggtgggag tggcatgg

18

10

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> INFECTIUOS SALMON ANAEMIA VIRUS

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<400> 6

agacttggct ccttccggtg

20

20

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> INFECTIUOS SALMON ANAEMIA VIRUS

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

30

<400> 7

cgggatccat ggccgataaa ggtatgac

28

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> INFECTIUOS SALMON ANAEMIA VIRUS

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

40

<400> 8

ggggtacctg cagtttcaaa tgtcagtgtc

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】バキュロウイルス発現SP-1 (1Hとも称される) タンパク質を注射されたウサギ716の免疫応答。免疫前血清 = 免疫前のウサギから採取した血清。対照抗原 = 非感染SHK細胞

50

のライセートでの対照。ISAV抗原 = ISAVに感染したSHK細胞のライセート。採血31-08-00 = 3回目の免疫の10日後に採取した抗血清。

【図2】 SP-1 (1Hとも称される) タンパク質断片配列番号3を注射されたウサギ41の免疫応答。免疫前血清 = 免疫前のウサギから採取した血清。対照抗原 = 非感染SHK細胞のライセートでの対照。ISAV抗原 = ISAVに感染したSHK細胞のライセート。採血04-05-00 = 3回目の免疫の10日後に採取した抗血清。

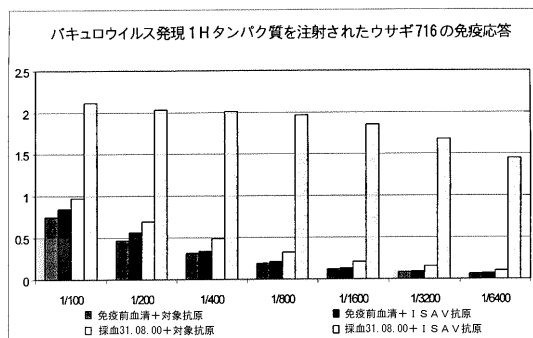
【図3】 SP-1 (1Hとも称される) タンパク質断片配列番号4を注射されたウサギ42の免疫応答。免疫前血清 = 免疫前のウサギから採取した血清。対照抗原 = 非感染SHK細胞のライセートでの対照。ISAV抗原 = ISAVに感染したSHK細胞のライセート。採血04-05-00 = 3回目の免疫の10日後に採取した抗血清。

【図4】 不活化ISAウイルスを注射したウサギ491の免疫応答。対照抗原 = 非感染SHK細胞のライセートでの対照。ISAV抗原 = ISAVに感染したSHK細胞のライセート。

10

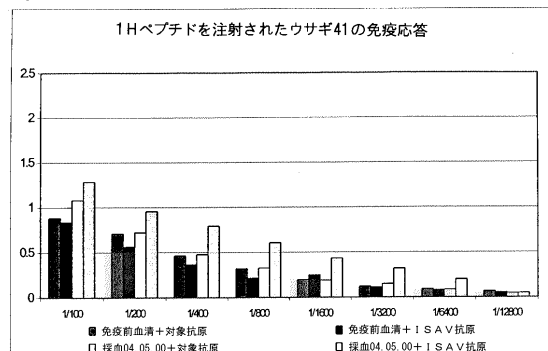
【図1】

Figure 1:



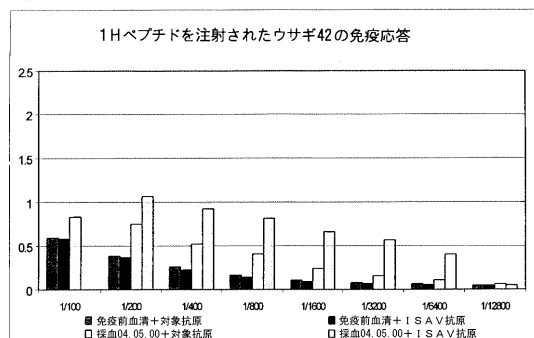
【図3】

Figure 3:



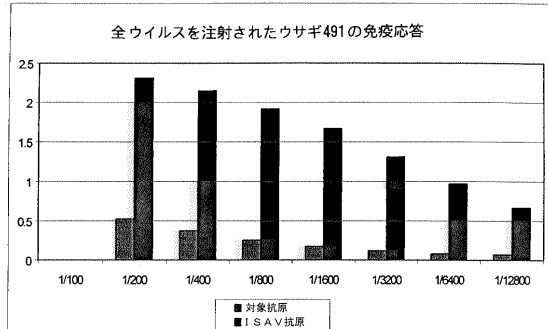
【図2】

Figure 2:



【図4】

Figure 4:



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(74)代理人 100119253
弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 エーリック・ピーリング・エー
ノルウエー国、5 0 0 6・ベルゲン、トルボル・ネロースガーテ・1 0

(72)発明者 ビヨーン・クロツセイ・ペー
ノルウエー国、5 2 2 7・ネスツン、バラヘイアン・1 3 3

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 国際公開第 9 7 / 0 1 4 6 7 3 (WO, A 1)
国際公開第 0 1 / 0 1 0 4 6 9 (WO, A 1)
J Gen Virol, vol.82, p.1757-1765 (2001)
Vet Res, vol.26, p.499-504 (1995)
J Virol, vol.71, p.9016-9023 (1997)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/09

C07K 14/11

C07K 16/10

PubMed