

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-510812

(P2010-510812A)

(43) 公表日 平成22年4月8日(2010.4.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	4 B 0 6 5
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2009-542665 (P2009-542665)	(71) 出願人	304039548
(86) (22) 出願日	平成20年11月21日 (2008.11.21)		コリア・インスティテュート・オブ・サイ
(85) 翻訳文提出日	平成21年5月27日 (2009.5.27)		エンス・アンド・テクノロジー
(86) 国際出願番号	PCT/KR2008/006893		大韓民国, ソウル 136-791, ソン
(87) 国際公開番号	W02009/066964		ブクーク, ハウォルゴクドン, 39-
(87) 国際公開日	平成21年5月28日 (2009.5.28)		1
(31) 優先権主張番号	10-2007-0119060	(74) 代理人	100102842
(32) 優先日	平成19年11月21日 (2007.11.21)		弁理士 葛和 清司
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(72) 発明者	ジョン, ヘスン
			大韓民国 ギョンギード 463-834
			、ソナムーシ、ブンダンーグ、ジョンジ
			ャードン 181、サンノクマウル #4
			05-904

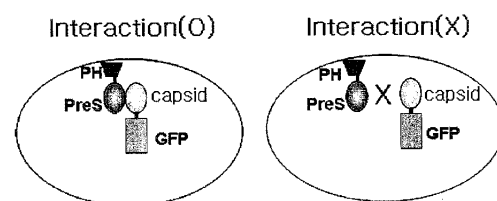
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞イメージング法に基づく、HBVカプシドタンパク質と表面タンパク質との間の相互作用を用いたHBV増殖抑制物質のスクリーニング方法

(57) 【要約】

本発明は、HBV (Hepatitis B Virus) 増殖に必要なカプシドタンパク質と表面タンパク質間の相互作用 (結合度) を細胞イメージングで測定してHBVの増殖抑制物質をスクリーニングする方法で、詳細には、HBVの表面タンパク質のPreSドメインと細胞膜標的化機能のPH (Pleckstrin homology) ドメインの配列を含む融合タンパク質、該融合タンパク質と相互作用するカプシドタンパク質と蛍光タンパク質 (GFP) を含む融合タンパク質間の相互作用によって細胞イメージングの変化を測定する方法に関するものである。本発明のHBV増殖に必要なタンパク質間の相互作用を細胞レベルでスクリーニングする方法を使用して、新しいHBVの増殖抑制物質を細胞レベルでのスクリーニングに有効に使用することができる。

Fig. 3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H B V のカプシドタンパク質ドメインに蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび H B V の表面タンパク質の P r e S ドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 2】

前記 H B V のカプシドタンパク質ドメインが、配列番号 19 のアミノ酸配列の H B V のカプシドタンパク質の中で p r o 配列を除外したドメイン（アミノ酸 30 - 214）であることを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

10

【請求項 3】

前記蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質（G F P）、赤色蛍光タンパク質（R F P）、青色蛍光タンパク質（B F P）、黄色蛍光タンパク質（Y F P）、シアン蛍光タンパク質（C F P）および強化された緑色蛍光タンパク質（E G F P）からなる群から選択されるいずれか 1 つであることを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 4】

前記 H B V の表面タンパク質の P r e S ドメインが、配列番号 20 のアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 5】

前記 H B V の表面タンパク質の P r e S ドメインが、配列番号 20 のアミノ酸の 93 番アミノ酸～117 番アミノ酸が欠失したドメインであることを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

20

【請求項 6】

前記細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが、P L C - δ (p h o s p h o l i p a s e C d e l t a) の P H (P l e c k s t r i n h o m o l o g y) ドメイン (Genebank ID: 241276、アミノ酸 2 - 175)、E E A 1 (e a r l y e n d o s o m e a n t i g e n e 1) の F Y V E (N o f u l l n a m e) ドメイン (Genebank ID: L40157、アミノ酸 1352 - 1410)、I N G 2 (I n h i b i t o r o f g r o w t h 2) の P H D (P r o l y l - h y d r o x y l a s e) ドメイン (Genebank ID: NM_001564、アミノ酸 212 - 261)、タンパク質キナーゼ C の C 2 (c a l c i u m / l i p i d - b i n d i n g) ドメイン (Genebank ID: NM002737、アミノ酸 172 - 260) およびグアニンヌクレオチド交換因子 D B S (G u a n i n e n u c l e o t i d e e x c h a n g e f a c t o r D B S) の S E C 1 4 (S . c e r e v i s i a e p h o s p h a t i d y l i n o s i t o l t r a n s f e r p r o t e i n h o m o l o g y) ドメイン (Genenbank ID: AB_116074、アミノ酸 90 - 236) からなる群から選択されたいずれかひとつであることを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

30

【請求項 7】

前記 H B V のカプシドタンパク質ドメインに蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質が、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

40

【請求項 8】

前記 H B V の表面タンパク質の P r e S ドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質が、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 9】

前記 H B V の表面タンパク質の P r e S ドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質が、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

50

【請求項 10】

請求項 1 ないし請求項 9 のいずれか一項の発現ベクターまたは H B V の表面タンパク質の P r e S ドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む第 1 発現ベクター、および前記融合タンパク質と相互作用する H B V のカプシドタンパク質ドメインに蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む第 2 発現ベクターが共に形質導入された動物細胞。

【請求項 11】

前記動物細胞が、H H E K 2 9 3 T、C O S 7、H e L a および C H O 細胞からなる群から選択されたいずれかひとつであることを特徴とする、請求項 10 に記載の動物細胞。

10

【請求項 12】

1) 請求項 10 または請求項 11 の形質導入された動物細胞を培養しながら候補物質を処理する工程と、

2) 蛍光顕微鏡を使用して、工程 1) で発現された蛍光タンパク質の蛍光イメージを撮影する工程、および、

3) 蛍光イメージが細胞質に位置するようにする候補物質を選別する工程とを含む H B V の増殖を抑制する物質をスクリーニングする方法。

【請求項 13】

請求項 10 または請求項 11 の動物細胞を含む H B V 増殖を抑制する物質のスクリーニングキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、H B V (H e p a t i t i s B V i r u s) の増殖に必要なカプシドタンパク質と表面タンパク質との間の相互作用 (結合度) を細胞イメージングで測定して、H B V の増殖抑制物質をスクリーニングする方法であり、より詳細には、H B V の表面タンパク質の P r e S ドメインと細胞膜標的化機能の P H (P l e c k s t r i n h o m o l o g y) ドメインの配列を含む融合タンパク質と、該融合タンパク質と相互作用するカプシドタンパク質と蛍光タンパク質 (G F P) を含む融合タンパク質との間の相互作用による細胞イメージングの変化を測定して、H B V 増殖を抑制する物質をスクリーニングする方法に関するものである。

30

【背景技術】

【0002】

H B V は、B 型肝炎を誘発するヘパドナウイルス科系統のウイルスであり、世界中の約 2 億人に達する人々が H B V 保有者である。H B V に対するワクチンは、すでに開発されて広く普及しているが、すでに感染した人を治療するための治療剤としては、ラミブジン (l a m i v u d i n e) とインターフェロン (i n t e r f e r o n) のみが使用されている。この中でラミブジンは、H B V の D N A ポリメラーゼの活性を抑制する特性があるが、長期投与すると耐性のあるウイルスが発生するため、その適用が制限されている。したがって、より多様な H B V 治療剤の開発が求められている。

40

【0003】

今まで、B 型肝炎ウイルスの抑制物質として、インターフェロン、核酸誘導体または免疫調節物質などが開発されてきたが、満足に値する効能を有したものは、ほとんどないのが実情であり、B 型肝炎ウイルスの増殖を抑制する物質として、ウイルスが受容体に付着することを阻害したり、ウイルスの活性タンパク質やポリメラーゼを特異的に阻害したりする物質を探索する研究が行なわれてきた。最近、H B V タンパク質の多様な活性を抑制する物質の開発が試みられている。H B V が感染した細胞において、H B V の組み立てのためには、H B V のカプシド (c a p s i d) タンパク質と表面タンパク質との相互作用が必要である。H B V のカプシドタンパク質は、H B V 核酸と結合して、直径 30 nm の大きさのヌクレオカプシド粒子を構成する。H B V の表面タンパク質として、一つの遺伝

50

子 (S gene) から三種類の L、M、S タンパク質が生合成された後、細胞内 ER 脂質膜で発現し、前記ヌクレオカプシドと特異的結合をし、同時に ER の脂質膜が HBV ヌクレオカプシドを取り囲みながら、完成した形態の HBV 粒子を形成するようになる (Volker B&Don G、PNAS USA, 1991 年, 第 88 巻, 1059-1063 頁)。このような過程で、HBV ヌクレオカプシドの表面に存在するカプシドタンパク質と表面タンパク質、特に PreS と命名された L タンパク質の N-末端のアミノ酸残基 1-163 に該当するドメインとの間の選択的な結合が、HBV 粒子の形成を誘発するようになり、このような二つのタンパク質間の相互作用は、HBV の増殖を抑制する物質の開発の標的となり得る。このような HBV のカプシドタンパク質と表面タンパク質との間の相互作用をスクリーニングするために、組換えタンパク質を使用した免疫アッセイが開発された (Asif-Ullah M 等, Antiviral Res, 2006 年, 第 70 巻, 85-90 頁)。前記方法は、大腸菌で発現した組換えタンパク質を使用することによって特徴付けられる。

10

【0004】

しかし、最近の新薬開発過程において、化合物の生理活性を測定する方法として、精製された標的タンパク質の活性を測定する方法以外に、細胞を対象に標的タンパク質の活性を測定する方法が活発に模索されている。標的細胞における化合物の生理活性を測定する方法は、目的とする生理活性を測定すると同時に、化合物の細胞透過性と毒性を同時に検出することができる長所があり、より効果的なスクリーニング方法として認識されている。

20

【0005】

HBV が感染した細胞内で、HBV のカプシドタンパク質と HBV 核酸を含むヌクレオカプシド粒子は、細胞の小胞体膜に発現した HBV の表面タンパク質と特異的結合をしながら活性を有する完成した HBV 粒子を形成するようになる。このような HBV タンパク質間の結合は、HBV のカプシドタンパク質と表面タンパク質の PreS ドメインとの間の選択的な相互作用によって決定される。したがって、HBV のカプシドタンパク質と表面タンパク質の PreS ドメインとの間の結合を細胞レベルで測定することができれば、前記測定方法を細胞スクリーニング方法に使用して、これらタンパク質間の結合を抑制する化合物を効果的にスクリーニングすることができる。このような活性を有する化合物は、HBV 増殖を抑制することができる機能を有するものであり、したがって、HBV によって誘発される肝炎治療剤として用いることができる。

30

【0006】

本発明は、HBV の表面タンパク質の PreS ドメインと細胞膜標的化 (targeting) 機能の PH 配列を含む融合タンパク質、前記タンパク質と相互作用するカプシドタンパク質と蛍光タンパク質 (GFP) を含む融合タンパク質を使用して、これらタンパク質の相互作用によって蛍光シグナルの細胞分布が変化するようになり、これを蛍光顕微鏡で測定する方法に関するものである。本発明は、HBV 増殖に必要なタンパク質間の相互作用を細胞レベルでスクリーニングする方法であり、新しい HBV の増殖抑制物質を細胞レベルでスクリーニングするのに有効に用いることができる。

40

【0007】

したがって、本発明者等は、HBV のカプシドタンパク質と表面タンパク質との相互作用を細胞レベルで測定することができる方法を開発して、HBV のカプシドタンパク質と表面タンパク質との間の相互作用を阻害してウイルス増殖を抑制することができる物質をスクリーニングするのに有効に用いることができることを確認して、本発明を完成した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、細胞レベルで HBV カプシドタンパク質と表面タンパク質との間の相互作用を測定して、効果的に HBV の増殖を抑制することができる物質をスクリーニングする方法を提供することである。

50

【課題を解決するための手段】

【0009】

前記目的を達成するために、本発明は、HBVのカプシドタンパク質に蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、および、HBVの表面タンパク質のPreSドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるあるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質をコードする他のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【0010】

また本発明は、前記発現ベクターまたはHBVの表面タンパク質のPreSドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるあるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む第1発現ベクター、および、前記融合タンパク質と相互作用するHBVのカプシドタンパク質に蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む第2発現ベクターが共に形質導入された動物細胞を提供する。

10

【0011】

さらに本発明は、1) 培養中に前記動物細胞に候補物質を処理する工程、2) 蛍光顕微鏡を使用して、工程1)で発現した蛍光タンパク質の蛍光イメージを得る工程、および、3) 細胞質の蛍光イメージに位置付けられた候補物質を選別する工程を含む、HBVの増殖を抑制する物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0012】

20

併せて、本発明は、前記動物細胞を含むHBVの増殖を抑制する物質のスクリーニングキットを提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明のHBV増殖に必要なタンパク質間の相互作用をスクリーニングする方法は、新しいHBVの増殖抑制物質を細胞レベルでスクリーニングするのに有効に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

30

【図1】図1は、HBVの表面タンパク質のPreSドメインが細胞膜を標的化するPHドメインのN-末端に連結された融合タンパク質(PreS-PH)とカプシドタンパク質(HBcAg)が緑色蛍光タンパク質(GFP)のN-末端に連結された融合タンパク質(カプシド-GFP)の構造を示した模式図である。

【図2】図2は、PreS-PH、カプシド-GFP、変異体PreS-PHタンパク質の同時発現ベクターの開裂地図を示した模式図である：a：pHBsPH-HBcGFP；b：pHBc-GFP；及び、c：pΔHBsPH-HBcGFP。

【図3】図3は、カプシド-GFPタンパク質がPreS-PHタンパク質との相互作用によって細胞質から細胞膜に移動する原理を示した模式図である。

【図4】図4は、細胞で発現したカプシド-GFPタンパク質の蛍光イメージが、細胞質に存在したあと、PreS-PHタンパク質と同時に発現する場合、PreSとの相互作用によって細胞膜でイメージシグナルが変化することを示した写真である：a：pHBc-GFP；b：pHBsPH-HBcGFP；及び、c：pΔHBsPH-HBcGFP。

40

【図5】図5は、PreS由来のペプチドがカプシドタンパク質とPreSタンパク質との相互作用を抑制することを示したグラフである。

【図6】図6は、細胞で発現したカプシド-GFPの蛍光イメージが、PreS由来のペプチドによって細胞質に位置することを示した写真である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を詳しく説明する。

50

【0016】

本発明は、HBVのカプシドタンパク質に蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、および、HBVの表面タンパク質のPreSドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクターを提供する。

【0017】

前記発現ベクターは、骨格ベクターにHBVのカプシドタンパク質に蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、および、HBVの表面タンパク質のPreSドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが連結して含まれる。本発明の方法で使用できる骨格ベクターは、動物細胞形質導入に使用可能な任意のベクターを使用することができ、特に制限されるものではないが、pBud-CE4.1、pcDNA3.1、pcDNA4およびpEF6からなる群から選択されるものが好ましい。本発明の好ましい態様において、pBud-CE4.1を使用した。

【0018】

前記カプシドタンパク質は、カプシドタンパク質全長または表面タンパク質と相互作用することができるフラグメントであり得る。本発明の好ましい態様において、配列番号19のアミノ酸配列のHBVのカプシドタンパク質の中で、pro配列(pro sequence)を除外した部位(アミノ酸30-214)を使用した。

【0019】

前記蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質(GFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)および強化された緑色蛍光タンパク質(EGFP)などを例示することができるが、これらに制限されず、本発明の好ましい態様では、GFPを使用した。

【0020】

前記表面タンパク質は、表面タンパク質のPreSドメインの全長または、カプシドタンパク質と相互作用することができるPreSドメインのフラグメント若しくはコアタンパク質と相互作用することができる93番アミノ酸から117番アミノ酸の範囲のドメインが欠失したHBVの表面タンパク質のPreSドメインのフラグメントであることができる。本発明の好ましい態様では、カプシドタンパク質と相互作用することができる表面タンパク質の配列番号20で表されるアミノ酸配列を有するPreSドメインを使用した。また、他の好ましい態様では、前記PreSドメインから、コアタンパク質と相互作用する93番アミノ酸から117番アミノ酸のドメインが欠失したドメインを使用した。

【0021】

前記細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインは、PLC- δ (phospholipase C delta)のPH (Pleckstrin homology) ドメイン (Genebank ID: 241276、アミノ酸2-175)、EEA1 (early endosome antigen1)のFYVE (No full name) ドメイン (Genebank ID: L40157、アミノ酸1352-1410)、ING2 (Inhibitor of growth 2)のPHD (Prolyl-hydroxylase) ドメイン (Genebank ID: NM_001564、アミノ酸212-261)、タンパク質キナーゼCのC2 (calcium/lipid-binding) ドメイン (Genebank ID: NM002737、アミノ酸172-260) およびグアニンヌクレオチド交換因子DBS (Guanine nucleotide exchange factor DBS)のSEC14 (Saccharomyces cerevisiae phosphatidylinositol transfer protein homology) ドメイン (Genebank ID: AB_116074、アミノ酸90-236)などを例示することができるが、これに制限されず、本発明の好ましい態様では、PLC- δ のPHドメインを使用した。

【0022】

前記HBVのカプシドタンパク質に蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質は、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有する（図2b参照）。前記配列番号4で表されるアミノ酸配列は、配列番号3で表される塩基配列によってコードされることを特徴とする。

【0023】

前記HBVの表面タンパク質のPreSドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質は、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有する（図2a参照）。前記配列番号2で表されるアミノ酸配列は、配列番号1で表される塩基配列によってコードされることを特徴とする。

【0024】

また、他の本発明の好ましい態様では、HBVの表面タンパク質のPreSドメインは、前記PreSドメインの、コアタンパク質と相互作用する93番アミノ酸から117番アミノ酸までを除去したドメインと代替して使用可能である。すなわち、コア領域と相互作用するPreSドメインの93番アミノ酸から117番アミノ酸までを除去したタンパク質ドメインに、細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質は、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有する（図2c参照）。前記配列番号6で表されるアミノ酸配列は、配列番号5で表される塩基配列によってコードされることを特徴とする。

【0025】

HBVのカプシドタンパク質ドメインに蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質およびHBVの表面タンパク質のPreSドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質を同時に発現することができる発現ベクター（pHBsPH-HBcGFP、図4b参照）を使用したものより、HBVのカプシドタンパク質ドメインに蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質およびPreSドメインのコアタンパク質と相互作用する93番アミノ酸から117番アミノ酸までを除去したタンパク質ドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質を発現することができる発現ベクター（pΔHBsPH-HBcGFP、図4c参照）を使用した場合、コアタンパク質と表面タンパク質の相互作用を排除することで、さらに特異的にカプシドタンパク質と表面タンパク質の相互作用を観察することができる（図4参照）。

【0026】

本発明のカプシドタンパク質ドメインは、蛍光タンパク質と連結して使用することができる。前記表面タンパク質のPreSドメインは、細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインと連結して使用することができる（図1参照）。前記蛍光タンパク質と連結されたカプシドタンパク質ドメインが、細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインと連結された表面タンパク質のPreSドメインと結合することで、蛍光タンパク質と連結されたカプシドタンパク質ドメインは、細胞質から細胞膜に移動することができる（図3参照）。PreS由来のペプチドによってカプシドタンパク質ドメインとPreSドメインの相互作用が抑制されて、カプシドタンパク質に連結された蛍光タンパク質の蛍光イメージが、細胞膜ではなく細胞質に位置することを確認することで（図5および図6参照）、本発明の蛍光タンパク質と連結されたカプシドタンパク質ドメインと細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインと連結された表面タンパク質のPreSドメインの結合が、特異的であることを確認した。

【0027】

また、本発明は、前記発現ベクターに形質導入された動物細胞を提供する。

前記動物細胞は、HEK293T、COS7、HeLaおよびCHOなどを例示することができるが、これらに制限されず、本発明の好ましい態様では、HEK293T細胞を使用した。

【0028】

また、本発明は、HBVの表面タンパク質のPreSドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された融合タンパク質（以下、PreS-

10

20

30

40

50

PH) をコードするポリヌクレオチドを含む第1発現ベクター、および前記融合タンパク質と相互作用するHBVのカプシドタンパク質ドメインに蛍光タンパク質が連結された融合タンパク質(以下、カプシド-GFP)をコードするポリヌクレオチドを含む第2発現ベクターが共に形質導入された動物細胞を提供する。

【0029】

本発明の好ましい実施態様では、PreS-PHとカプシド-GFPは、起源が異なるベクターに各々クローニングされて一つの動物細胞に共同形質導入することで、共同発現することができる。

【0030】

また、本発明は、1) 前記動物細胞を培養しながら候補物質を処理する工程と、2) 蛍光顕微鏡を使用して工程1) で発現した蛍光タンパク質の蛍光イメージを撮影する工程、および、3) 蛍光イメージが細胞質に位置するようにする候補物質を選別する工程とを含む、HBVの増殖を抑制する物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0031】

同時に、本発明は、前記動物細胞を含むHBVの増殖を抑制する物質のスクリーニングキットを提供する。

【0032】

以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。

但し、下記の実施例は、本発明を例示するだけのものであって、本発明の内容が下記実施例に限定されるものではない。

【0033】

<実施例1> 発現ベクター製造

<1-1> pCapsid-GFP遺伝子の製造

HBVカプシドタンパク質の中でpro配列を除外したドメイン(アミノ酸30-214)(配列番号19)を含むpHBcAg(Choi KJ等, Biochem Biophys Res Commun, 2004年, 第319巻, 959-66頁)を鋳型にして、配列番号7と配列番号8のプライマー対を使用してDNA重合連鎖反応法(PCR)で、95℃、1分; 55℃、30秒; 72℃、1分の条件で25回反復して合成した後、SalIとKpnIのDNA制限酵素で切断した後、同じ制限酵素で切断したpEGFP-N1(Clontech)ベクターに、T4 DNAリガーゼを使用して挿入して、カプシド-GFPが含まれたプラスミドであるpCapsid-GFPを製造した。このDNAを鋳型に、配列番号9と配列番号10のプライマー対を使用してDNA重合連鎖反応法でNotIとXhoIのDNA制限酵素を含んだカプシド-GFP DNA断片を作った。合成されたカプシド-GFPとpBud-CE4.1(Stratagene, 米国)をNotIとXhoIのDNA制限酵素で切断した後、T4 DNAリガーゼを使用して連結してpHBc-GFP(図2b)を製造し、DNA塩基配列を分析して配列番号4で表されるアミノ酸を暗号化する配列番号3のカプシド-GFP DNAが適切に挿入されたことを確認した。

【0034】

<1-2> PreS-PH遺伝子の製造

マウスcDNAを鋳型に、配列番号11と配列番号12のプライマー対を使用してPLC-δ(phospholipase C delta)のPHドメイン(Genebank ID: 241276, アミノ酸2-175)をDNA重合連鎖反応法(PCR)で、95℃、1分; 55℃、30秒; 72℃、1分の条件で25回反復して合成した。pTrx-PreS(Choi KJ等, Biochem Biophys Res Commun, 2004年, 第319巻, 959-66頁)を鋳型に、配列番号13と配列番号14のプライマー対を使用してHBV表面タンパク質の中でPreSドメイン(アミノ酸1-163)(配列番号20)を有するDNAをDNA重合連鎖反応法(PCR)で、95℃、1分; 55℃、30秒; 72℃、1分の条件で25回反復して合成した。前記方法で得たPreSをコードするDNAとPHをコードするDNAを鋳型に、配列番号15と

配列番号16のプライマー対を使用してDNA重合連鎖反応法（PCR）で、95℃、1分；55℃、30秒；72℃、1分の条件で25回反復してPreS-PH DNAを合成した。ここで、前記二つの鋳型DNAがオーバーラップしてPCRが遂行された。増幅されたDNAをHindIIIとXbaIのDNA制限酵素で切断した後、同じ制限酵素で切断したpHBc-GFPにT4 DNAリガーゼを使用して連結して、配列番号2で表されるアミノ酸を暗号化する配列番号1の塩基配列を有するDNAを含むpHBsPH-HBcGFP（図2b）を製造し、DNA塩基配列を分析して増幅されたDNAが適切に挿入されたことを確認した。

【0035】

PreSドメインの中でコアタンパク質と相互作用する93番アミノ酸から117番アミノ酸の欠失したドメインは、pHBsPH-HBcGFPを鋳型に、DNA重合連鎖反応法（PCR）で、95℃、30秒；55℃、1分；68℃、7分の条件で18回反復して、配列番号17と配列番号18のプライマーを使用して、配列番号6で表されるアミノ酸を暗号化する配列番号5の塩基配列を有するDNAを合成した。メチル化されたアデニンを認識して切断するDpnI制限酵素を処理して、PCR方法で合成してメチル化されないDNAを除外した部分を除去し、塩基配列分析を通じてpΔHBsPH-HBcGFP（図2c）を確認した。

【0036】

<実施例2>動物細胞での形質転換

<2-1>動物細胞の培養

HEK293T細胞は、5%CO₂と37℃の条件下で、10%FBSが供給されたDMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium；Gibco，米国）で培養した。細胞は、90%の密度で継代培養して、25%密度を維持しながら形質転換のために準備した。

【0037】

<2-2>動物細胞の形質転換

実施例2-1の方法で培養されたHEK293T細胞を継代培養して、カバーガラスが入っている6ウェルプレートで培養した。密度条件が40～60%になるように育てた後、リポフェクタミン（Invitrogen，米国）とPLUS試薬（Invitrogen，米国）を使用して、pHBc-GFP、pHBsPH-HBcGFPまたはpΔHBsPH-HBcGFPを前記動物細胞に感染させた。前記形質導入した細胞を48時間培養してタンパク質を生成するようにした。

【0038】

<実施例3>PreS由来のペプチドによるカプシドタンパク質とPreSタンパク質の相互作用の抑制

PreS由来のペプチド（ΔL4bペプチド；配列番号21：RQPTPI SPPLRDSHPQAMQWNS；ペプトロン、韓国）が、PreSタンパク質とカプシドタンパク質の相互作用を抑制できることを確認した。

【0039】

pTrx-PreS（Choi KJ等，Biochem Biophys Res Commun，2004年，第319巻，959-66頁）が、形質導入された大腸菌から精製されたチオレドキシシンが融合したPreSタンパク質を緩衝溶液-A（50mM sodium phosphate，0.15M NaCl，pH8.0）に10g/mlの濃度で溶解した後、前記混合溶液100μlを96ウェルプレート（Costar，米国）に入れて、一時間室温でインキュベートして固定化させた。5%（w/v）のスキムミルクを含む緩衝溶液-Aで前記プレートをブロッキングした後、色々な濃度にシリアル希釈したΔL4bペプチドとpHBcAg（Choi KJ等，Biochem Biophys Res Commun，2004年，第319巻，959-66頁）が形質導入された大腸菌から精製されたカプシドタンパク質（最終濃度0.4mM）を添加した。さらに、60分間室温でインキュベートしてPBS-T緩衝溶液（50mM sodi

10

20

30

40

50

um phosphate, 0.15M NaCl, pH7.4および0.1%ツイーン20)で6回洗浄した後(300 μ l/ウェル)、抗-HBcAg抗体(1:2000, Cat. No. K0112162, KOMA biotechnology, 韓国)100 μ lで一時間培養して、HRPが標識された抗ウサギ2次抗体(1:2000, Sigma, 米国)で、さらに一時間培養した。前記プレートをPBS-T緩衝溶液で6回洗浄した後、OPD溶液(ペロキシド基質緩衝溶液に1mg/mlの濃度で溶解し; Pierce, 米国)100 μ lを添加して発色反応を遂行した。2.5M硫酸100 μ lを添加して反応を終了させて、マイクロプレートリーダーSpectra Max 340スペクトロメーター(Molecular Devices Corp., 米国)を使用して、490nmで吸光度を測定した。

10

【0040】

その結果、PreS由来のペプチドが濃度によってカプシドタンパク質とPreSタンパク質の相互作用を抑制することを確認した(図5)。

【0041】

<実施例4>蛍光顕微鏡を使用した細胞イメージング測定

<4-1>相互結合の測定

pHBc-GFP、pHBsPH-HBcGFPまたはp Δ HBsPH-HBcGFPで形質導入されたHEK293T細胞が育ったプレートからカバーガラスを回収して、氷冷したPBSで洗浄した後、顕微鏡観察のためのスライドガラスに付けた。蛍光顕微鏡を使用してGFPを観察することができる490 $\pm$ 20/528 $\pm$ 38nm(励起/放射)波長のフィルターを通じて細胞を観察した。

20

【0042】

その結果、pHBc-GFPで形質導入した細胞では、GFPの蛍光イメージが細胞質に位置して、pHBsPH-HBcGFPまたはp Δ HBsPH-HBcGFPで形質導入した細胞で、GFPの蛍光イメージが細胞膜に位置することを確認した(図4)。また、p Δ HBsPH-HBcGFPで形質導入した細胞での蛍光イメージの面積が、pHBsPH-HBcGFPで形質導入した細胞より狭いことを確認した。

【0043】

<4-2>相互結合抑制の測定

pHBc-GFP、pHBsPH-HBcGFPまたはp Δ HBsPH-HBcGFPで形質導入したHEK293T細胞の培養期間の間、PreSとカプシド間の相互作用を抑制するPreS由来のペプチド(Δ L4bペプチド; 配列番号21)を50 μ Mの濃度で一日の間、60%癒着細胞に処理した。形質導入したHEK293T細胞が育ったプレートからカバーガラスを回収して、氷冷したPBSで洗浄した後、顕微鏡観察のためのスライドガラスに付けた。蛍光顕微鏡を使用して、GFPを観察することができる490 $\pm$ 20/528 $\pm$ 38nm(励起/放射)波長のフィルターを通じて細胞を観察した。

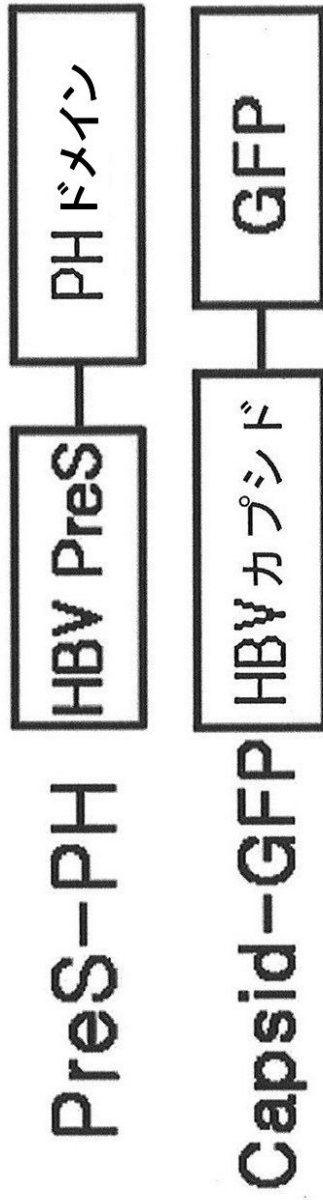
30

【0044】

その結果、前記抑制によって細胞内で発現されたGFPの蛍光イメージが、細胞膜ではなく細胞質に位置することを確認した(図6)。

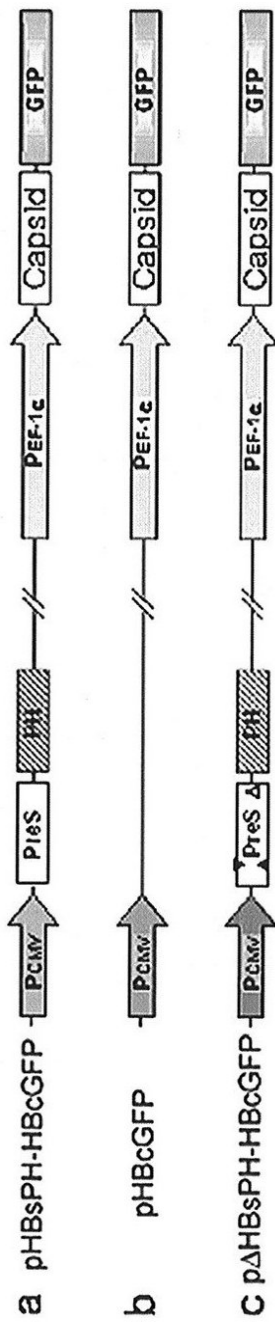
【図 1】

図 1



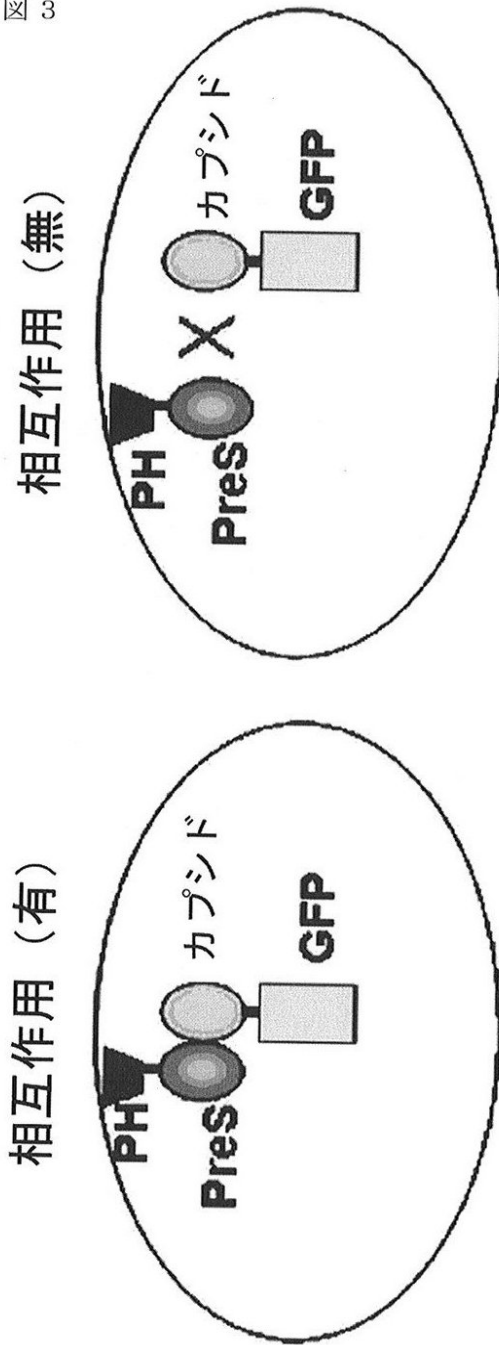
【 図 2 】

図 2



【図 3】

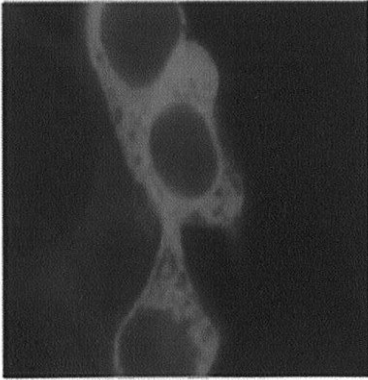
図 3



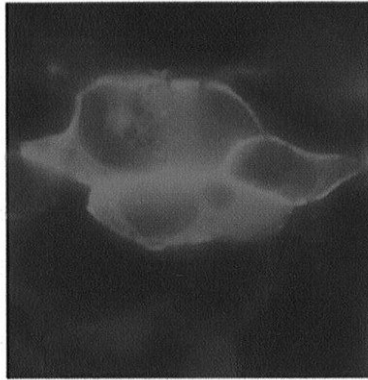
【図 4】

図 4

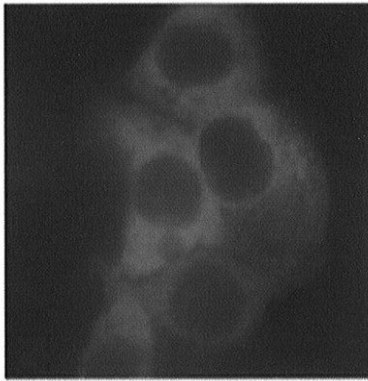
a pHBcGFP



b pHBsPH-HBcGFP

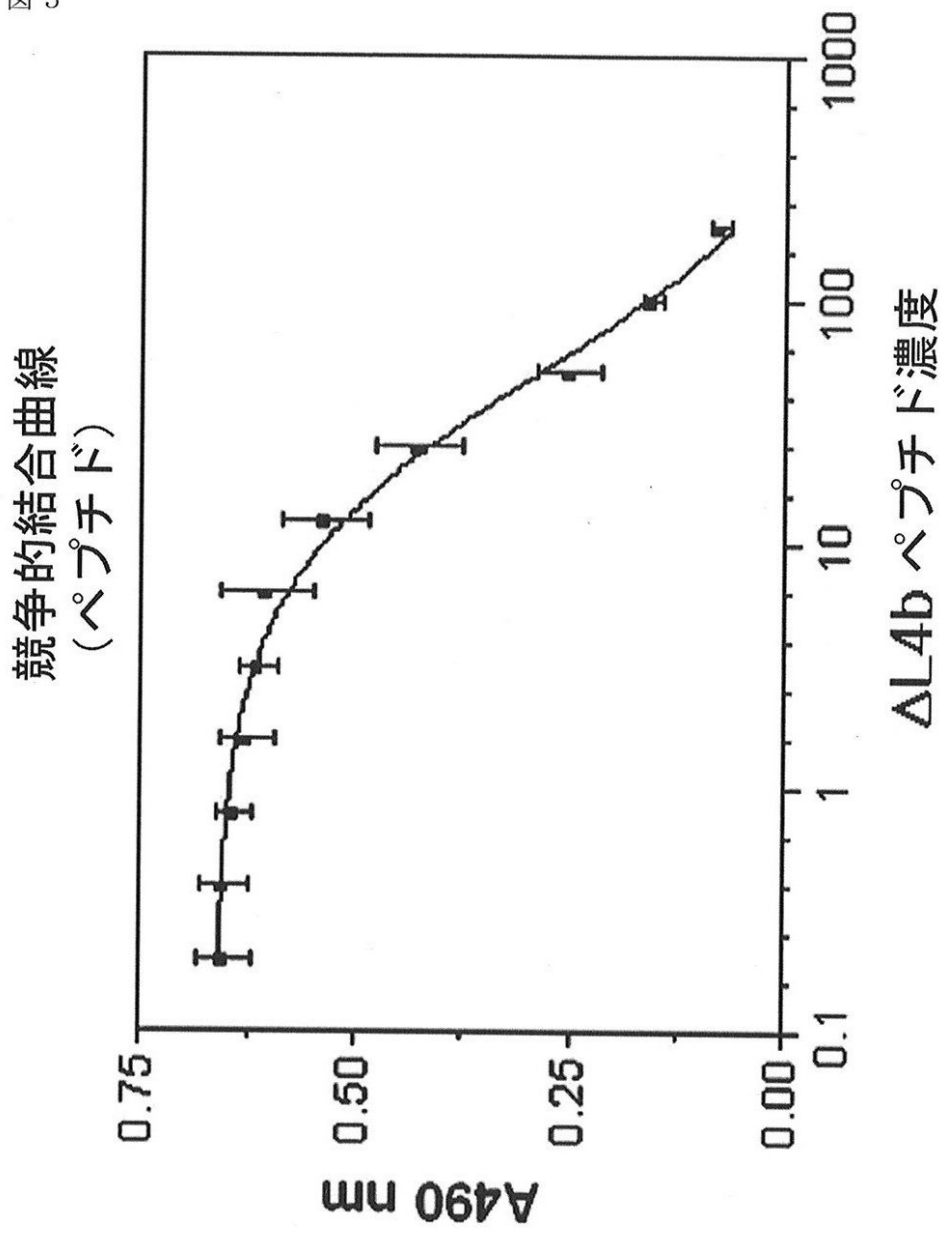


c pΔHBsPH-HBcGFP



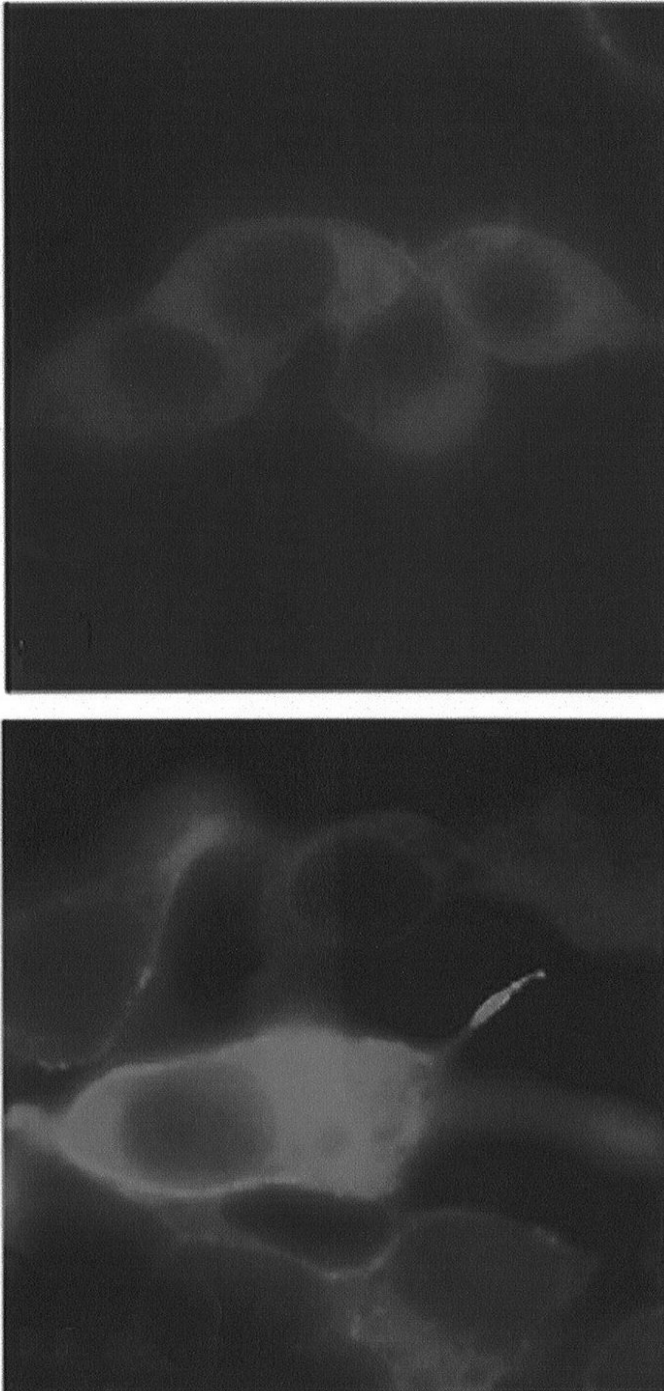
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



【配列表】

2010510812000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年5月27日(2009.5.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1】

H B V のカプシドタンパク質ドメインに蛍光タンパク質が連結された第 1 融合タンパク質をコードする第 1 ポリヌクレオチドと、

H B V の表面タンパク質の P r e S ドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された第 2 融合タンパク質をコードする第 2 ポリヌクレオチドとを含む発現ベクター。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 6】

前記細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが、P L C - δ (p h o s p h o l i p a s e C d e l t a) の P H (P l e c k s t r i n h o m o l o g y) ドメイン (G e n e b a n k I D : 2 4 1 2 7 6 、アミノ酸 2 - 1 7 5) 、 E E A 1 (e a r l y e n d o s o m e a n t i g e n e 1) の F Y V E ドメイン (G e n e b a n k I D : L 4 0 1 5 7 、アミノ酸 1 3 5 2 - 1 4 1 0) 、 I N G 2 (I n h i b i t o r o f g r o w t h 2) の P H D (P r o l y l - h y d r o x y l a s e) ドメイン (G e n e b a n k I D : N M _ 0 0 1 5 6 4 、アミノ酸 2 1 2 - 2 6 1) 、タンパク質キナーゼ C の C 2 (c a l c i u m / l i p i d - b i n d i n g) ドメイン (G e n e b a n k I D : N M 0 0 2 7 3 7 、アミノ酸 1 7 2 - 2 6 0) およびグアニンヌクレオチド交換因子 D B S (G u a n i n e n u c l e o t i d e e x c h a n g e f a c t o r D B S) の S E C 1 4 (S . c e r e v i s i a e p h o s p h a t i d y l i n o s i t o l t r a n s f e r p r o t e i n h o m o l o g y) ドメイン (G e n e b a n k I D : A B _ 1 1 6 0 7 4 、アミノ酸 9 0 - 2 3 6) からなる群から選択されたいずれかひとつであることを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 8】

前記第 2 融合タンパク質が、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 9】

前記第 2 融合タンパク質の P r e S ドメインが、配列番号 2 0 のアミノ酸の 9 3 番アミノ酸～1 1 7 番アミノ酸が欠失し、前記第 2 融合タンパク質が、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の発現ベクター。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 1 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 0】

請求項 1 ないし請求項 9 のいずれか一項の発現ベクター、または、H B V のカプシドタ

ンパク質ドメインに蛍光タンパク質が連結された第1融合タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチドを含む第1発現ベクターおよびHBVの表面タンパク質のPreSドメインに細胞膜標的化機能を遂行することができるタンパク質ドメインが連結された第2融合タンパク質をコードする第2ポリヌクレオチドを含む第2発現ベクターが共に形質導入された動物細胞。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2008/006893
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/533(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12N 15/09(2006.01)i, C12N 15/51(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC8 and above		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models since 1975 Japanese Utility models and application for Utility models since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS (KIPO internal), Google, NCBI PubMed (HBV, capsid protein, surface protein, PreS, interaction, fluorescen*, and similar terms)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 1020060013128 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 09 February 2006. See the whole document.	1-11
A	M. ASIF-ULAH, et al. 'Identification of compounds that inhibit the interaction between core and surface protein of hepatitis B virus.' In Antiviral Research Vol. 70:85-90 (2006). See the whole document.	1-11
A	W. S. TAN. 'Inhibition of hepatitis B virus assembly with synthetic peptides derived from the viral surface and core antigens.' In J. Gen. Appl. Microbiol., Vol.48:103-107 (2002). See the whole document.	1-11
A	WO 2000/32625 A1 (BIOGEN, INC.) 8 June 2000. See the whole document.	1-11
A	WO 1998/18818 A2 (BIOGEN, INC.) 7 May 1998. See the whole document.	1-11
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 MARCH 2009 (26.03.2009)		Date of mailing of the international search report 27 MARCH 2009 (27.03.2009)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer AHN, Kyu Jeong Telephone No. 82-42-481-8158 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2008/006893

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. type of material

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☒ contained in the international application as filed
☒ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2008/006893

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 12 and 13
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2008/006893

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR1020060013128 A	09.02.2006	None	
WO2000-32625 A1	08.06.2000	AU 1841700 A	19.06.2000
		AU 2000-18417 A1	19.06.2000
		AU 2000-18417 B2	19.06.2000
		AU 770225 B2	19.02.2004
		BR 9915942 A	21.08.2001
		CA 2352738 A1	08.06.2000
		CN 1179973 C	15.12.2004
		CN 1332749 A	23.01.2002
		CN 1332749	23.01.2002
		CZ 20011907 A3	16.01.2002
		EA 4497 B1	29.04.2004
		EE 200100292 A	15.08.2002
		EP 1135408 A1	26.09.2001
		HU 0104946 A2	29.04.2002
		HU 0104946 A3	28.10.2004
		IL 143475 D0	21.04.2002
		IS 5957 A	31.05.2001
		JP 2002-532387	02.10.2002
		JP 2002-532387 T	02.10.2002
		JP 2008-074867	03.04.2008
		KR 10-2001-0081068	25.08.2001
		NO 20012760 A	06.08.2001
		NO 20012760 D0	05.06.2001
		NZ 512056 A	30.01.2004
		PL 348766 A1	03.06.2002
		SK 7602001 A3	05.03.2002
		TR 200102423 T2	21.02.2002
		US 6627202	30.09.2003
		US 2002-0064533 A1	30.05.2002
		US 2004-234554 A1	25.11.2004
		US 6627202 B2	30.09.2003
		US 6827937 B2	07.12.2004
WO 1998-18818 A2	07.05.1998	AT 255594 T	15.12.2003
		AU 5163598 A	22.05.1998
		CA 2270401 A1	07.05.1998
		DE 69726602 D1	15.01.2004
		DE 69726602 T2	30.09.2004
		DK 952982 T3	29.03.2004
		EP 0952982 B1	03.12.2003
		EP 0952982 A2	03.11.1999
		EP 0952982 B1	03.12.2003
		ES 2207753 T3	01.06.2004
		JP 2001-503750	21.03.2001
		JP 2008-120814	29.05.2008
		PT 952982 T	31.03.2004
		US 6544520	08.04.2003
		US 6544520 B1	08.04.2003

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 オ, ソ ジン

大韓民国 ソウル 136-838、ソンブクグ、ジャンウィー２ドン #238-75

(72)発明者 ユ, ヨン ギュ

大韓民国 ソウル 136-702、ソンブクグ、ジョンヌンードン、ケミストリー デパート
メント コクミン ユニバーシティ

(72)発明者 キム, ユン－キュン

大韓民国 ギョンギード 420-100、ブチョン－シ、ウォンミーグ、ヨクゴクードン、ドン
ブセタービル アパートメント #301-507

Fターム(参考) 2G045 BB20 CB01 FA16 FB12

4B024 AA11 BA63 BA80 CA01 CA09 CA11 CA20 EA04 GA11 HA01

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR59

QR62 QS25 QS32 QX01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44 CA46