

(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2005-538716

(P2005-538716A)

(43) 公表日 平成17年12月22日(2005.12.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 S	2 G O 5 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 B O 6 3
C O 7 K 14/005	A 6 1 P 31/12 1 7 1	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-536174 (P2004-536174)	(71) 出願人	505093840
(86) (22) 出願日	平成15年9月11日 (2003. 9. 11)		リージェンツ オブ ザ ユニヴァーシテ ィ オブ カリフォルニア
(85) 翻訳文提出日	平成17年5月13日 (2005. 5. 13)		アメリカ合衆国 カリフォルニア オーク ランド フランクリン ストリート 1 1 1 1 トゥウエルフス フロア
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/028622	(71) 出願人	505093851
(87) 国際公開番号	W02004/025256		ユニヴァーシティ オブ ワシントン アメリカ合衆国 ワシントン シアトル ノースイースト フォーティフィフス ス トリート 1 1 0 7 スウィート 2 0 0 2
(87) 国際公開日	平成16年3月25日 (2004. 3. 25)		
(31) 優先権主張番号	60/410, 572		
(32) 優先日	平成14年9月13日 (2002. 9. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インビトロにおけるキャプシドの組立を介するウイルスの脱構築

(57) 【要約】

ウイルスキャプシド及びキャプシド中間体の翻訳及び組立の無細胞法を、不明のウイルスの脱構築における使用のために、かつ不明ウイルスのウイルスキャプシドの組立を阻害する化合物のスクリーニングのために開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非天然ウイルスのゲノムにおけるキャプシドの組立に必要なウイルス遺伝子の同定方法であって、前記方法が：

前記ウイルス遺伝子をコードする核酸を前記ウイルスゲノムから推測的に単離して；

無細胞翻訳系を前記核酸を用いて設定して；かつ

キャプシドの組立が生じたことを、前記ウイルス遺伝子がキャプシドの組立に必要なことの指標として判断することを含む方法。

【請求項 2】

非天然ウイルスのゲノムから単離され、キャプシドの組立に必要なウイルス遺伝子をコードする核酸を有する組成物。

10

【請求項 3】

非天然ウイルスのキャプシドの組立を阻害する化合物の同定方法であって、前記方法が：

無細胞翻訳系を、前記非天然ウイルスのキャプシドの組立に必要なタンパク質をコードする核酸を用いて、前記化合物の存在下及び不存在下で設定して；かつ

キャプシドの組立が生じたかどうかを、前記化合物がキャプシドの組立を阻害するかどうかに関しての指標として判断し、その際、キャプシドの組立の阻害を、(a)無細胞系における組立中間体の分布の変化；(b)無細胞系における宿主タンパク質のグリセロール勾配又はスクロース勾配上での局在の変化；(c)細胞内における組立中間体の分布の変化；(d)細胞内における組立中間体の産生レベルの変化；及び(e)細胞内におけるウイルス感染の間に見られる宿主タンパク質とキャプシドタンパク質との同時局在の変化からなる群から選択した変化から推定することを含む方法。

20

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法により同定された化合物を有し、キャプシドの組立が前記化合物の存在下で阻害される組成物。

【請求項 5】

非天然ウイルスのウイルスキャプシドの組立に必要な 1 種以上のウイルスタンパク質と相互作用する 1 種以上の宿主タンパク質を得る方法であって、前記方法が：

無細胞翻訳系を、前記非天然ウイルスのキャプシドの組立に必要な 1 種以上のタンパク質をコードする核酸を用いて設定し、これにより前記 1 種以上のキャプシドタンパク質の翻訳産物を産生させて；

30

前記翻訳混合物を、重合されたウイルスキャプシドタンパク質と宿主タンパク質との複合体を有する 1 種以上のキャプシド中間体を前記翻訳産物が組立てるのに十分な時間にわたリインキュベートして、；

前記 1 種以上のキャプシド中間体を単離して；かつ

前記 1 種以上のキャプシド中間体を解離させて、これにより前記 1 種以上の宿主タンパク質を得ることを含む方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法により得られた宿主タンパク質を有するキャプシド中間体。

40

【請求項 7】

請求項 5 に記載の方法により得られた宿主タンパク質。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法により得られた宿主タンパク質のヒトホモログ。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の宿主タンパク質に対する抗体。

【請求項 10】

非天然ウイルスのキャプシドの組立に必要な宿主タンパク質と 1 種以上のウイルスタンパク質との結合を阻害する請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

50

非天然ウイルスの組立に關与するキャプシド中間体を得る方法であって、前記方法が：
キャプシドの組立に必要なウイルス遺伝子をコードする核酸と、無細胞翻訳タンパク質混合物とを組合せて；

前記混合物を、前記ウイルス遺伝子の翻訳産物からウイルスキャプシド中間体を組立てるのに十分な時間にわたりインキュベートして；

前記翻訳産物を、1種以上のキャプシド中間体の分画に分離して；かつ

前記1種以上のキャプシド中間体を単離し、これにより前記非天然ウイルスのキャプシド中間体を得ることを含む方法。

【請求項12】

非天然ウイルスのキャプシドの組立に關与する宿主タンパク質の同定方法であって、前記方法が：

請求項5に記載の方法により得られた宿主タンパク質を変性させて；

個々の前記宿主タンパク質をシークエンシングして、かつ

個々の前記宿主タンパク質の配列と既知の宿主タンパク質の配列とを比較して、これにより前記非天然ウイルスのキャプシドの組立に關与する宿主タンパク質の同一性を得ることを含む方法。

【請求項13】

非天然ウイルスのキャプシドの組立を妨害する化合物の同定方法であって、前記方法が：

前記キャプシドの組立に必要なタンパク質を哺乳動物細胞内において発現させて；

前記タンパク質と1種以上の宿主タンパク質との同時局在を、前記哺乳動物細胞内において免疫蛍光法を使用して同定して；かつ

化合物を、前記キャプシドに必要な前記タンパク質と前記1種以上の宿主タンパク質との同時局在を前記哺乳動物細胞内で妨害する化合物に基づいてスクリーニングし、その際、キャプシドの組立を妨害する化合物を、前記免疫蛍光法による同時局在の染色パターンから散在の染色パターンへの変化により同定することを含む方法。

【請求項14】

前記化合物が、前記哺乳動物細胞内において毒性を惹起しないか又は宿主ストレスタンパク質をアップレギュレートしない請求項13に記載の方法。

【請求項15】

非天然ウイルスのキャプシドの組立を阻害する化合物の同定方法であって、前記方法が：

評価化合物を、キャプシドの組立に必要な1種以上のタンパク質をコードするウイルス由来の核酸を用いて設定された無細胞翻訳混合物に添加して、これによりキャプシドを産生させて；

前記評価化合物の不存在下での組立と、前記評価化合物の存在下での組立とを比較し、その際、前記化合物の存在下で組立がほとんど測定されないことがキャプシドの組立を阻害する化合物の指標であることを含む方法。

【請求項16】

前記化合物が、小分子である請求項15に記載の方法。

【請求項17】

非天然ウイルスの細胞内でのキャプシド形成の阻害方法であって、前記方法が：前記細胞に請求項15に記載の方法により選択した化合物を提供することを含む方法。

【請求項18】

前記細胞が、ヒト細胞である請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記化合物が、抗キャプシド抗体である請求項15に記載の方法。

【請求項20】

不明のウイルス剤を伴うバイオテロリストの攻撃により症状の治療が必要な動物の症状の治療方法であって、前記方法が：

10

20

30

40

50

キャプシドの組立に關与するウイルス遺伝子をコードする核酸を前記ウイルスゲノムから推測的に単離して；

無細胞翻訳系を、前記核酸を用いて、前記ウイルス遺伝子の翻訳産物からウイルスキャプシド中間体を組立てるのに十分な時間で設定して；

前記翻訳産物を1種以上のキャプシド中間体の分画に分離して；

前記1種以上のキャプシド中間体を単離して；

前記キャプシド中間体を分離して、前記キャプシド中間体中で1種以上のウイルスタンパク質に結合された1種以上の宿主タンパク質を得て；

個々の前記1種以上の宿主タンパク質の生化学的特性と、複数種のウイルスキャプシド組立シャペロンの生化学的特性を有するライブラリーとを比較し、その際、該シャペロンは、前記ライブラリーの個々のメンバー及びウイルスキャプシドタンパク質の間の相互作用を阻害する1種以上の小分子と個々に相互参照されており、

前記動物に、前記1種以上の宿主タンパク質と共通の生化学的特性を有する前記ライブラリーの個々のメンバーと相互参照されている小分子を供給して、これにより前記症状を治療することを含む方法。

10

【請求項21】

前記生化学的特性が、ウイルスキャプシドタンパク質に対する結合領域のアミノ酸配列である請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記動物が、哺乳動物である請求項21に記載の方法。

20

【請求項23】

前記動物が、ヒトである請求項21に記載の方法。

【請求項24】

非天然ウイルスのウイルスキャプシドの製造方法であって、前記方法が：

無細胞翻訳系を前記ウイルス由来の前記核酸を用いて設定して、かつ

前記翻訳混合物を、前記翻訳産物がキャプシドを組立てるのに十分な時間にわたりインキュベートして；かつ

前記キャプシドを単離することを含む方法。

【請求項25】

非天然ウイルスのウイルスキャプシドに対する抗体。

30

【請求項26】

前記抗体が、モノクローナル抗体である請求項25に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、ウイルスの複製を阻害する薬品標的物を同定するための方法及び組成物並びに不明ウイルス及び/又は合成ウイルス、特に生物兵器として使用されるウイルスによる感染を予防及び/又は治療するための方法及び/又は組成物に関する。

【0002】

発明の背景技術

生物戦は、多数の民を死に至らしめ、かつ経済的に重要な家畜及び作物を殲滅するために使用されうる。米国及び他の地域におけるここ最近のテロリストの攻撃により、生物兵器により惹起された驚異が焦点となり、かつ軍人及び民間人の両方のための大規模な予防接種戦略についての議論を煽った。この戦略は、古典的な生物兵器用薬剤の使用を想定している。しかしながら、遺伝子工学の威力により、天然の生物兵器用薬剤と比べてより一段と毒性が強く、かつ現代のワクチンによる防御を逃れることができる先進世代の生物兵器用薬剤の実現性が高まっている。

40

【0003】

生物兵器として使用することができた古典的な生物薬剤については、例えば100を超

50

える細菌、ウイルス、リケッチア、真菌及び毒素が列記される。しかしながら、ほとんどの専門家は、おそらく生物兵器は例えば脾脱疽、痘瘡、ペスト、ボツリヌス毒素、野兔病又は出血熱ウイルスであると考えている。これらの物質に生物工学を使用すれば、人工ウイルス、抗生物質耐性の微生物株、毒素又は他の新種の生物兵器、例えば細菌性プロウイルス（人が細菌性疾患のために抗生物質で治療される際にウイルスが放出されるように、細菌内に挿入されたウイルス）を創出することができる。

【0004】

おそらく生物兵器として使用することができる出血熱ウイルス群には、エボラ、マールブルグ、ラッサ熱、新世界アレナウイルス、レフトバレー熱、黄熱、オムスク出血熱、及びキャサヌール森林病ウイルスが属している。米国疾病予防センター（CDC）は、出血熱ウイルスを痘瘡及び脾脱疽と同様に“カテゴリーA”の生物兵器物質とみなしている。それというのも、これらのウイルスは広範に及ぶ疾患及び死亡を惹起する潜在性を有しており、かつ該ウイルスには、大発生を食い止める国による特別な衛生的準備手段が必要であるからである。フィロウイルス科に属するエボラ及びマールブルグは、人から人へ蔓延することができ、かつ最も致命的な出血熱疾患の一部をなす。エボラはその感染者の50～90パーセントを致死させる一方で、マールブルグは全体の23～70パーセントを死に至らしめる。これらのウイルスの大発生のための特定の治療は存在しない。上記の各ウイルスは、その毒性、環境中での安定性、高感染性及び幾つかの場合における高程度の伝染性のために、バイオテロリストにより使用される候補であると考えられている。

【0005】

ウイルスを生物兵器として使用する攻撃が勃発すれば、適切な治療を判断するために原因物質を診断することは、出血熱ウイルス又は他のウイルスを問わず困難なことがある。例として、ほとんどの出血熱疾患は熱及び発疹から始まり、これは他の一般的な疾患と類似している。ほとんどの臨床医がこれらの疾患に精通していないだけでなく、広範に利用できる診断用試験が存在しないので、これらのウイルスを研究対象とするための特別な施設が必要とされている。米国においては、ジョージア州アトランタのCDC及びメリーランド州フレデリックのUSAMRIIDが、出血熱ウイルス診断用の装備施設を収容しているにすぎない。既知のウイルス、例えばエボラについては、抗原捕獲固定酵素免疫測定（ELISA）試験法、IgM ELISA、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、又はウイルス単離法を使用して、症状の開始から数日以内で診断を設定することができる。疾患過程の後期又は回復後の被験者については、IgM抗体及びIgG抗体について試験することができる；この疾患はまた、死亡患者において免疫組織化学試験法、ウイルス単離法、又はPCRを使用することにより回顧的に診断することもできる。これらの試験により、研究所職員が潜在的に感染にさらされるだけでなく、原因物質についての情報をも必要とされる。たとえこの情報を有していても、原因物質と反応する抗体の有効性、PCR用の適切なプライマーの有効性及びウイルス単離のために好適な生細胞内での十分なウイルス増殖能を欠いていることがある。突然変異したウイルス、遺伝的に改変されたウイルス及び/又はハイブリッドウイルスであれば、市販の抗体及びプライマーはもはや診断には有用ではなく、かつこのウイルスの性質についての情報を有さないのであれば、診断及び潜在的なワクチン開発並びに適切な治療薬の組合せを判断するためにウイルスを単離するにあたり、これを増殖させる適切な宿主細胞を判断するのが困難なことがある。

【0006】

治療については、一般的なウイルス及び特に出血熱ウイルスに対処する効果的な療法剤又はワクチンはほとんど市販されていない。抗ウイルス薬リバビリンは、アレナウイルス科及びブニヤウイルス科のウイルスについての治療のために推奨されているにすぎない。フィロウイルス科（エボラ、マールブルグ）及びフラビウイルス科については、現在は感染者の症状を治療する支持療法が利用できるにすぎない。黄熱を予防するワクチンは存在するが、広範に市販されているものではなく、かつ暴露後に保護を提供するには有用ではない。更に、生物兵器の兵器庫の非常に脅威的な改変病原菌が、これらが攻撃に使用されるまで不明のままということもある。従って、潜在的な薬品標的物を同定するための方法

10

20

30

40

50

及び組成物並びに不明のウイルス、例えば生物兵器として使用されるウイルスの感染を予防及び/又は治療するための方法及び組成物を開発し、かつ生産的な抗体をバイオテクノロジーの潜在的な標的となる人々に送達するための方法及び組成物を開発することは興味深いことである。また、たとえ感染物質に関する正確な情報の不存在下においてもウイルス複製を特異的に阻害する感染者治療用の化合物が必要とされている。

【0007】

参考文献

無細胞系が使用され、キャプシドを細胞質内で予め形成するウイルスの組立 (リンガッパその他著 (1994年) 細胞生物学誌 125号: 99~111頁 (Lingappa et al (1994) J. Cell Biol. 125:99-111) ; サカリアンその他著 (1996年) ウイルス学誌 70号: 3706~3715頁 (Sakalian et al (1996) J. Virol 70:3706-15) ; 並びにサカリアン及びハンター著 (1999年) ウイルス学誌 73号: 8073~8082頁 (Sakalian and Hunter (1999) J. Virol 73:8073-82)) 並びに膜界面で組立てられるキャプシド (リンガッパその他著 (1997年) 細胞生物学誌 136号: 567~581頁 (Lingappa et al (1997) J. Cell Biol 136:567-81) ; シンフその他著 (2001年) ウイルス学 279号: 257~270頁 (Singh et al (2001) Virology 279:257-70) 並びにツィーマンその他著 (2002年) ネイチャー誌 24号: 88~92頁 (Zimmerman et al (2002) Nature 24:88-92)) が研究されている。しかしながら、これらの研究においてはキャプシド形成に關与する組立中間体及び宿主タンパク質の何れについても試験されず、及び/又は不明のウイルスを同定する際のこれらの潜在的な使用及び/又は不明のウイルスの感染の治療及び予防は認識されなかった。

10

20

【0008】

発明の要約

本発明は、特に不明のウイルス又は非天然ウイルスのキャプシドの組立に關与するウイルス及び宿主のタンパク質を無細胞翻訳系を使用して同定及び単離するための方法及び組成物並びに同定された宿主タンパク質及びウイルスタンパク質を特異的に標的として、かつキャプシドの組立を阻害する薬品を同定するための方法及び組成物に關する。宿主及びウイルスのタンパク質の同定方法は、キャプシドタンパク質をコードするウイルスの核酸を同定する段階、そうして同定されたウイルスの核酸からの転写物をインビトロで調製する段階、キャプシドの組立に必要な任意の宿主タンパク質 (シャペロン) を含有する無細胞タンパク質翻訳混合物中でウイルスの転写物を翻訳させて転写産物を産生させる段階; 得られた混合物を、ウイルスのキャプシド組立タンパク質を合成して、かつ新たに合成されたタンパク質からキャプシド組立中間体を組立てるのに十分な時間にわたりインキュベートする段階、キャプシド組立中間体を単離する段階、及びキャプシド組立中間体をこれらの成分であるコードされたウイルス性タンパク質と宿主タンパク質とに分離する段階を含む。不明のウイルス剤の感染症状を治療するための薬剤の同定方法は、無細胞発現系を使用する潜在的な小分子のハイスクリーニング及び評価化合物の存在下で形成されたキャプシドの量と評価化合物の不存下でのキャプシド組立物の量との比較を含む。代替法は、宿主タンパク質の1つ以上の生化学的特性と、複数種のウイルスキャプシド組立シャペロンの生化学的特性を有する宿主タンパク質のライブラリーの個々のメンバーの生化学的特性とを比較し、その際、該シャペロンは、このライブラリーの個々のメンバー及びウイルスキャプシドタンパク質の間の相互作用を阻害する1種以上の小分子と個々に相互参照されており、かつ不明のウイルスの感染対象の動物又は感染動物に、宿主タンパク質と共通する1つ以上の生化学的特性を有するライブラリーの個々のメンバーと相互参照されている小分子を提供することである。ウイルスが天然ウイルスであるか、又は天然ウイルスに關連するハイブリッドであれば、宿主タンパク質をライブラリー中において同定することを使用して、不明ウイルスを同定することができる。本発明は、キャプシド形成に關与するウイルス及び宿主のタンパク質の相互作用を特異的に阻害して、これによりウイルス複製を阻害する化合物の同定に使用が見出され、かつウイルスの予防及び治療のプロトコールに使用することができる。本発明はまた、診断又はワクチンのための、

30

40

50

キャプシドの組立に關与するウイルスキャプシドタンパク質、組立中間体、若しくは宿主タンパク質又はこれらの配座異性体に対する抗体を調製する際の使用を見出すものである。

【0009】

図面の簡単な説明

図1は、ウイルスキャプシドの組立のための無細胞系の図を示すものである。キャプシド転写物をインビトロで合成して、かつコムギ胚抽出物、エネルギー再生系、19種の未標識アミノ酸及び1種の標識アミノ酸（一般的には、 ^{35}S -メチオニン又は ^{35}S -システイン）に添加する。反応物を26で150分にわたりインキュベートする。キャプシドタンパク質の翻訳に続く一連の翻訳後の事象（ウイルスキャプシドの種々の類型によって異なる）により、完全に組立られたキャプシドを形成するキャプシド鎖の20~40%がもたらされる。反応の終盤では、種々の大きさの産物（即ち、未組立コアポリペプチド、部分的に組立てられたコアポリペプチド及び完全に組立てられたコアポリペプチド）を、スクロース勾配上で速度沈降により相互から分離することができる。

10

【0010】

図2は、無細胞系（図2A）及び細胞系（図2B）において形成されたHIVキャプシドの速度沈降勾配上での移動を、順次的に回収された各分画についての屈折率により評価された浮遊密度のプロット形態（白抜き丸）、及びデンストメトリーにより評価された各分画中のGagタンパク質の量のプロット形態（黒塗りの丸）で示すものである。

【0011】

図3は、無細胞反応混合物中におけるHIVキャプシド組立の速度沈降によるパルスチエイス分析を示すものであり、10S、80S、150S、500S及び750Sの複合体の推定位置がグラフ頂部のマーカーにより示されており、該無細胞反応混合物を連続的に標識した場合（図3A）、並びに4分間の反応段階で反応物に未標識 ^{35}S システインを添加して、かつアリコートをして25分間の反応後（図3B）及び15分間の反応後（図3C）に採り出して沈降分析した場合についてであって、更に試料をSDSゲル及びラジオグラフィーにより分析したものを示すものである。

20

【0012】

図4A 68kDの宿主タンパク質は、無細胞系において選択的にHIV-1Gagと会合する。

30

【0013】

(A) 無細胞の翻訳を、HIV-1Gag、 α -チューブリン、 α -グロビン、HBVコア、又はHIV-1Gagの組立不能となったp41突然変異体の転写物の何れかを用いて設定した $^{7, 11, 15}$ 。従来に記載 $^{1, 5}$ と同様に、反応産物を未変性条件下で23cモノクローナル抗体（23c）又は非免疫性ラットIgG（N）を使用して免疫沈降させた。免疫沈降された試料のオートラジオグラフを示す。各組のトータルのレーン（T）は、5%のインプット翻訳産物を示している。

【0014】

(B) HIV-1Gag転写物を用いて設定された無細胞組立反応物を未変性条件下又は変性後の何れかで、(A)に記載の抗体を使用して免疫沈降させて、これを示す。トータルのレーン（T）は、5%のインプット翻訳産物を示している。

40

【0015】

(C) 23cに対する抗体を、HIV-1Gag転写物を用いて設定された2 μ lの無細胞反応物とのインキュベーションの前に、種々の量のWG上清分画（40S以下の可溶性タンパク質を含有する）と共にブレインキュベートした。免疫沈降を、未変性条件下で実施した。2 μ lの無細胞反応物中に存在するWG抽出物の量を、1WG当量と定義した。抗体のブレインキュベートに使用されるWG上清の量は、2~200WG当量の範囲に及んだ。（100WG当量は、14mg/mlの最終WGタンパク質濃度に相当する。）グラフは、免疫沈降され、オートラジオグラフについてのデンストメトリーにより定量された放射能標識Gagの量を（任意の単位で）示すものである。バーは、独立した3回の

50

実験からの平均の標準誤差を示している。挿入図は、上記のブレインキュベーションの間に添加されたWG当量の量を伴う免疫沈降の代表的なオートラジオグラフを示すものである。

【0016】

(D) WG抽出物の高速上清を、23c抗体を使用してウエスタンブロッティングにより直接的に分析して(レーン2)、又は最初に未変性条件下で非免疫性ラットIgG(レーン1)又は23c抗体(レーン3)の何れかを使用して免疫沈降させて、かつ次いで23c抗体を用いてイムノブロッティングにより分析した。黒塗りの矢印は、直接的なウエスタンブロッティング後(レーン2)又は23c抗体との免疫沈降(レーン3)に引き続くウエスタンブロッティング後の23c抗体により認識されたWG抽出物中の68kD抗原を示すものである。イムノブロッティングに使用された二次抗体は、HRPが結合されたプロテインGであり、これはまた免疫沈降に使用される抗体の重鎖及び軽鎖を認識し、これを示す(HC及びLC)。(レーン1及び3に使用された異なる抗体のHC及びLC鎖は、異なって移動することに留意のこと。)分子量マーカーを左部に示すとともに、免疫沈降(IP)及びウエスタンブロッティング(WB)に使用された抗体を各レーンの上部に示す。

10

【0017】

図5 HP68とHIV-1キャプシド組立中間体とが会合する。(A)無細胞組立反応物を図2と同様のHIV-1Gag転写物を用いて設定し、但し該反応物は³⁵S-システインを含有した^{7,15}。3分間の翻訳の段階で過剰の未標識システインを添加して更なる放射能標識を回避して、かつ翻訳物のアリコートを示された種々の時間(追跡時間)で採り出して分析した。これらをSDS-PAGE及びARにより直接的に分析して、各時間に存在する放射能標識Gagの全量を測定し、かつ未変性条件下で23c又は非免疫性ラットIgEの何れかを用いて免疫沈降により分析した(データ示さず)。(A)に示された相対的な23cの免疫反応性を測定するために、独立した3回の実験からの免疫沈降された試料のオートラジオグラフをデンストメトリーにより定量して、各時点について全体の放射能標識Gag合成物を標準化して、平均化して、かつ次いで追跡時間に関してグラフで示した。誤差のバーは、平均の標準誤差を示すものである。(B、C)連続的に標識される無細胞翻訳物をGag転写物を用いて設定して、2時間にわたりインキュベートして、かつ次いで方法項目の記載と同様に13mLのスクロース勾配上で速度沈降させた。各分画中に存在する放射能標識Gagの全量を定量して、グラフに示した(B)。種々のS値の複合体の推定位置を上部に示す。黒塗りのバーは、完全に組立てられた基準未熟HIV-1キャプシドの並行の速度沈降勾配上での移動位置を示すものである(基準未熟キャプシドとの比較により判断した)。矢印は、上記のキャプシド組立中間体の位置を示すものである。更に各勾配分画を、未変性条件下で23c抗体を使用して免疫沈降させて、かつSDS-PAGE及びARにより分析した。23c抗体により免疫共沈降された放射能標識Gagの量を定量して、かつ任意の単位でグラフに示した(C)。S値マーカー及び黒塗りのバーは、上記のAに記載のものである。放射能標識Gagポリペプチドは、非免疫性血清によっては何れの分画からも免疫沈降されなかった(データ示さず)。この実験を3回繰り返した;示されたデータは1つの代表的な実験からのものである。

20

30

40

【0018】

図6 WGH P68のアミノ酸配列。WGH P68と、事前にRNアーゼL阻害剤と称されているHuHP68とのアラインメントは、71%の全体的なアミノ酸の同一性を示している。アラインメント中の間隔をダッシュにより示し、同一のアミノ酸をアスタリスクにより示し、かつ保存されたアミノ酸を点により示す。白抜きの枠は、両方のホモログ中に存在する2箇所のPループモチーフを示すものである。黒塗りの枠は、マイクロシーケンシングにより得られ、かつPCR用の縮重オリゴヌクレオチドを構築するために使用された2箇所のアミノ酸配列領域を示している。矢印は、N末端切断突然変異体WGH P68-Tr1中の最後のアミノ酸を示している。

【0019】

50

図7は、切断されたHP68はビリオン産生を遮断することを示すものである。(図7A~D)、Cos-1細胞(図7A、B)又は293T細胞(図7C、B)を、WGHP68-Tr1発現プラスミド及び空のプラスミドを種々の量で用いて、更にHIV-1Gag発現プラスミド(図7A、B)又はpBRUenv(図7C、B)を用いて同時トランスフェクションさせ、これを示す。培地(図7A、C)をGag抗体(p55;p24)を用いてイムノプロットングして、かつ軽鎖に対する抗体トレーサー(LC)を用いてリプローブした。細胞溶解物(図7B、D)を、WGHP68抗血清(HP)又はGag抗体(p55;p24)を使用してイムノプロットングして、かつアクチン抗体(アクチン)を使用してリプローブした。矢印：白抜きは未変性HP68；黒塗りはWGHP68-Tr1。棒グラフ：3回の実験からのプロットを、試料希釈標準曲線を使用して定量したものである。

10

【0020】

図8は、HuHP68は哺乳動物細胞内においてHIV-1Gagを免疫共沈降させることを示すものである。HuHP68b(HP)又は非免疫性血清(N)を使用する、未変性(未変性)又は変性(変性)の免疫沈降に続いてイムノプロットング(IB)を用いて：(図8A)pBRUenvを用いてトランスフェクションされ、+/-RNアーゼA処理の293T細胞について；(図8B)、Gagを発現させるCos-1細胞について；(図8C)、Gag(Gag)、組立能を有さないGag突然変異体(p41)、組立能を有するGag突然変異体(p46)又は対照ベクターを発現させるCos-1細胞について(未変性での免疫沈降のみ)；又は(図8D)、HIV-1に慢性感染されたACH-2細胞について実施した。HIV-1p24及びp55(矢印)、5%のインプット細胞溶解物(T)及び10µlの培地(T培地)を示す。

20

【0021】

図9は、HuHP68はHIV-1Gag及びVifを免疫共沈降させるが、Nef又はRNアーゼLを免疫共沈降させないことを示すものである。(図9A)、pBRUenv又はHIV-1Gagプラスミドを用いてトランスフェクションされたCos-1細胞を、未変性(未変性)又は変性(変性)の条件下で、HuHP68b(HP)又は非免疫性血清(N)を使用して免疫沈降させて、かつHuHP68(HP)、HIV-1Gag、HIV-1Vif、HIV-1Nef、RNアーゼL(RL)、又はアクチンに対する抗体を用いてイムノプロットング(IB)した。トータル(T)：免疫沈降に使用された5%のインプット細胞溶解物(HP:10%)。幾つかのアクチンのレーンの上端部は、二次物と交差反応する重鎖を含む。(図9B)は、pBRUenvがトランスフェクションされたCos-1細胞の溶解物を10mMのEDTA含有緩衝液中に回収して、かつHuHP68ペプチド又は希釈した対照と一緒にプレインキュベートされたビーズを使用して免疫共沈降させた結果を示すものである。

30

【0022】

図10 HP68は哺乳動物細胞内においてHIV-1Gagにより漸増される。Cos-1細胞を、pBRUenv(列1~3)又はGagの361番目の残基の後に停止コドンコードするpBRUp41env(列4)を用いてトランスフェクションし、かつ二重標識間接免疫蛍光法により試験した。視野をHP68染色(赤、上段に示す)又はGag染色(緑、中段)について試験した。像を併合して、HP68とGagとの重複を示した(黄；下段)。左下のバーは、約50µmに相当する。

40

【0023】

図11 HuHP68は、哺乳動物細胞内においてHIV-1Vifを免疫共沈降させるが、RNアーゼLを免疫共沈降させない。(A)pBRUenv又はGag発現ベクターの何れかを用いてトランスフェクションされたCos-1細胞を回収し、かつ未変性条件下(未変性)で又は変性後(変性)にHuHP68b(HP)又は非免疫性血清(N)を使用して免疫沈降させて、かつHuHP68(HP)、HIV-1p55Gag、HIV-1Vif、HIV-1Nef、RNアーゼL(RL)又はアクチンに対する抗体

50

の何れかを用いてイムノプロットティング (I B) により分析し、これを示す。トータル
 のレーン (T) は、免疫沈降に使用された 5 % のインプット細胞溶解物を示している。ウサ
 ギ内で生成された抗体をイムノプロットティング (H P 、 R L 、 及びアクチンのイムノプロ
 ット) に使用する場合には、重鎖の人工産物が I P レーン中に 5 0 k D で見られる (アク
 チンのパネルが最も顕著である) 。 (B) b P r u e n v を用いてトランスフェクショ
 ンされた C o s - 1 細胞を更に、未変性の条件下で 1 0 m M の E D T A の存在下で、かつ
 H u H P 6 8 抗血清を生成するのに使用された H u H P 6 8 ペプチド (2 0 0 μ M) の
 存在下又は不存在下 (H P ペプチド + 又は -) で免疫沈降させた。ペプチドを溶解させる
 のに使用された D M S O (0 . 2 5 %) は、それ単独では G a g 及び V i f の - H u H
 P 6 8 による免疫共沈降に対して影響を及ぼさなかった (データ示さず) 。 トータル
 のレーン (T) は、免疫沈降に使用された 5 % のインプット細胞溶解物を示しているが、但し
 H P イムノプロットのトータルは、 1 0 % のインプット細胞溶解物を示している。全ての
 実験を 3 回実施して、かつ示されるデータは代表的な実験からのものである。

10

【 0 0 2 4 】

図 1 2 は、 C o s - 1 細胞において、 H P 6 8 が H I V - 1 及び 2 種の初代単離物由来
 の H I V - 2 の G a g と会合するが、 C A / N C 結合部で切断された H I V - 1 G a g 又
 は H I V - 2 G a g の突然変異体とは会合しないことを示すものである。 C o s - 1 細胞
 を、 H I V - 1 G a g 又は H I V - 2 の 2 種の異なる初代単離物 (5 0 6 及び 3 0 4) 、
 S I V m a c 2 3 9 由来の G a g 、 若しくは C A / N C 結合部で切断された H I V - 1 、
 H I V - 2 又は S I V の変種 (T r) の G a g をコードするプラスミドを用いてトランス
 フェクションした。この溶解物を、 H P 6 8 に対するアフィニティー精製抗体 (H P) 又
 は非免疫性血清 (N) を用いて未変性又は変性条件下の何れかで免疫沈降させてこれを示
 し、かつ H P 6 8 に対する抗体 (H P) 又は G a g に対する抗体を用いてイムノプロッテ
 イング (I B) により分析した。トータル (トータル) は、 5 % の免疫沈降インプット物
 を示している。 H I V - 2 初代単離株の c D N A を、 S . L . フー博士 (Dr. S. L. Hu) か
 ら入手して、かつ S I V m a c 2 3 9 c D N A を P . ルシー博士 (Dr. P. Luciw) から入手
 した。

20

【 0 0 2 5 】

図 1 3 は、無細胞系において組立てられた H C V 及び H B V のコアの速度沈降を示すも
 のである。 H C V 又は H B V のコアの転写物を用いて設定された無細胞反応物を、 2 . 5
 時間にわたりインキュベートし、かつ 1 % の N P 4 0 を含有させて 2 m l のスクロース勾
 配上での速度沈降 (B e c k m a n 製 T L S 5 5 型ロータ内で 5 5 0 0 0 r p m \times 6 0 分)
) により分析した。分画 (各 2 0 0 マイクロリットル) を勾配の最上層から回収して、か
 つ S D S - P A G E 及びオートラジオグラフィにより試験した。両方の反応物中において
 、コア鎖が 1 0 0 S の粒子及び他の大きさの複合体を形成する。

30

【 0 0 2 6 】

図 1 4 は、無細胞系において産生された 1 0 0 S の粒子が H C V キャプシドと予想され
 る浮遊密度を有することを示すものである。 H C V コアの転写物を用いて設定された無細
 胞組立反応産物を、図 1 3 と同様に速度沈降により分離した。分画 6 及び 7 (1 0 0 S の
 コア粒子) を、 3 3 7 m g / m l の C s C l 溶液を使用して平衡遠心 (T L S 5 5 型 B e
 c k m a n 製ロータを使用、 5 0 0 0 0 r p m \times 2 0 時間) により分析した。分画を回収
 して、 T C A 沈殿させて、 S D S - P A G E 及びオートラジオグラフィにより分析し、か
 つデンストメトリーにより定量した。 H C V コアタンパク質は、分画 6 でピークに達した
 。分画 5 / 6 (勾配の中間層、矢印で示す) の密度は、 1 . 2 5 g / m l である。

40

【 0 0 2 7 】

図 1 5 は、コアの親水性相互作用ドメインを含有する突然変異体が無細胞系において組
 立てられることを示すものである。無細胞反応物を、野生型 H C V コア (C 1 9 1) 又は
 1 2 2 番目又は 1 1 5 番目のアミノ酸で切断されたコアの突然変異体 (C 1 2 2 と C 1 1
 5) を用いて設定して、かつ 2 m l のスクロース勾配上での速度沈降 (図 1 3 の記載と同
 様) により分析した。この分画を、 S D S - P A G E により試験し、かつオートラジオグ

50

ラフを定量した。グラフは、100S粒子中に存在する各コアタンパク質の量を全合成物の%として示すものである。

【0028】

図16は、HCVコアの免疫共沈降のための戦略を示すものである。

【0029】

図17は、HCVコアの60-C抗血清による免疫共沈降を示すものである。無細胞反応物をHCVコア、HIV-1Gag、又はHBVコアの何れかを用いて設定した。組立の間に、反応物を未変性条件下で、TCP-1の種々のエピトープに対する抗血清(60-C、60-N、23c、及び91a)又は非免疫性血清(NI)を用いて免疫沈降(IP)させた。IP溶出物をSDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより分析した。トータルは、IPを設定するために使用された5%のインプット物を示している。矢印は、全長キャプシドタンパク質の位置を示している。

10

【0030】

図18は、HBVコアの無細胞翻訳産物のスクロース勾配分画を示すものである。HBVコアcDNAを転写させて、かつ120分にわたり翻訳させた。次いで、この翻訳産物を2.0mlの10~50%のスクロース勾配上に重層して、かつ20000gで1時間にわたり遠心分離した。200マイクロリットルの分画を、勾配の最上層から底層まで(レーン1~11、それぞれ)順次的に採り出して、かつ沈殿層(レーン12)を1%のNP-40緩衝液中で再懸濁した。各分画のアリコートをしてSDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより分析して、放射能標識21kDコアポリペプチドのバンドを検出した。低分子量のHBVコアポリペプチドの2本の小さいバンドが(インビトロ翻訳物及びE・コリをトランスフェクションすることにより産生されたコアタンパク質の両方において)見られる。これらは、分解産物又は内部メチオンンでの翻訳開始結果物の何れかであると考えられる。分子量標準物の位置を示す。本類型の勾配中の11Sの標準物であるカタラーゼの位置(クーマシー染色により判断した)を矢印で示す。同様に、~100Sの沈降係数を有することが知られている組換えコア粒子の移動を矢印で示す。放射能標識HBVコアポリペプチドは、この勾配の3つの領域:分画1及び2に相当する最上層(T);分画6及び7に相当する中間層(M);及び分画12に相当する沈殿層(P)に移動し、これらを黒塗りのバーで示す。

20

【0031】

図19は、HBVコア粒子の組立のパルスチェイス分析を示すものである。インビトロでの転写及び翻訳を、最初の10分間にわたる[³⁵S]システインのパルスを用いて実施し、続いて未標識システインを用いて10分(A)、35分(B)、50分(C)、又は170分(D)の何れかについて追跡した。翻訳産物を、上記と同様にスクロース勾配上に重層して、遠心分離して、分画して、かつSDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより分析した。それぞれのオートラジオグラフの最上層(T)、中間層(M)、及び沈殿層(P)中に存在するバンドの密度の量を示しているそれぞれの棒グラフの右側にオートラジオグラフを示す。各時点で存在する放射能標識全長コアポリペプチドの全量は同様であり、このことは全翻訳物の1マイクロリットルのアリコートのバンドの密度の定量により判断した。標識コアポリペプチドは、勾配の最上層から沈殿層へと、かつ時間の経過につれて最終的には中間層へと巡る。

30

40

【0032】

図20は、細胞質ゾルのシャペロニンに対するポリクローナル抗血清の調製及び特性決定を示すものである。Aは、マウスTCP-1(42~57番目の位置)(ルイスその他著、1992年、ネイチャー誌358号:249~252頁(Lewis et al 1992 Nature 358:249-252))、S・シバタエ(S. Shibatae)のTF55(好熱性古細菌の熱ショックタンパク質)(55~70番目の位置)(トレントその他著、1991年、ネイチャー誌354号:490~493頁(Trent et al. 1991 Nature 354:490-493))及び酵母TCP-1(50~65番目の位置)(ウルシク及びカルバートソン著、1991年、分子細胞生物学11号:2629~2640頁(Ursic and Culbertson, 1991 Mol.

50

Cell Biol. 11:2629-2640)) 内に存在するアミノ酸配列のアラインメントを示すものである。マウスの配列のアミノ酸と同一のアミノ酸を、(.) により示す。マウス T C P - 1 由来の 4 2 ~ 5 7 番目のアミノ酸に相当する合成ペプチドを合成した。それというのも、この領域のホモロジーが高程度であるからである。このペプチドを担体タンパク質に結合させるか、又はそれ自体に架橋させて、かつ該ペプチドを使用して、ウサギポリクローナル抗血清 (抗 6 0) を生成させた。この抗血清を用いて、免疫沈降を変性条件下で、安定状態の [³⁵ S] メチオニン標識 H e L a 細胞の全細胞抽出物について実施した。B のレーン 1 に示すように、~ 6 0 k D のタンパク質を抗 6 0 により沈降させた。対照として、B のレーン 2 は、同様の実験において h s p 7 0 に対する抗血清を用いてなされた変性条件下での免疫沈降を示すものである。分子量マーカー (9 2、6 8、及び 4 5 k D) を左側に白抜きの鏝で示す。更に抗 6 0 は、未変性条件下で、可溶化された H e L a 細胞中で 6 0 k D タンパク質を免疫沈降させる。この抗血清により認識される抗原を更に特性決定するために、ウサギ網状赤血球抽出物及びコムギ胚抽出物を、1 0 ~ 5 0 % のスクロース勾配上に重層して、5 5 0 0 0 r p m で 6 0 分にわたり T L - 1 0 0 型 B e c k m a n 製の超遠心分離機内で遠心分離して、分画して、かつ S D S - P A G E により分析した。タンパク質をニトロセルロースに転写して、かつ C に示すように抗 6 0 を用いてイムノブロットングした。S 値を測定するために、タンパク質標準物を同時に分離勾配管内で遠心分離して、かつ分画を S D S - P A G E ゲルのクーマシー染色により可視化した。これらのマーカー (B S A 及び - マクログロブリン) の位置を矢印で示す。分子量マーカー (6 8 及び 4 5 k D) を右側に白抜きの鏝で示す。両方のイムノプロットにおいては単一のバンドのみが認識され、該バンドは 2 0 S の位置に移動する 6 0 k D タンパク質に相当するものである。このように抗 6 0 は、2 0 S の領域に移動する 6 0 k D タンパク質 (C C 6 0) を認識し、かつ該タンパク質はおそらく T C P - 1 又はそのホモログの何れかであると考えられる。

10

20

【 0 0 3 3 】

図 2 1 は、H B V コアの翻訳産物の免疫沈降を示すものである。H B V コアをインビトロで 6 0 分にわたり翻訳させた。この翻訳産物を、スクロース勾配上で遠心分離して、かつ分画した。最上層 (“ T ”)、中間層 (M) 及び沈殿層領域 (P) からの分画を、等量のアリコートに分割して、かつ免疫沈降を、材料及び方法項目の記載と同様に未変性 (A) 又は変性 (B) 条件下の何れかで、抗コア抗血清 (C)、非免疫性血清 (N)、又は抗 6 0 (6 0) の何れかを使用して実施した。免疫沈降された標識コアタンパク質を、S D S - P A G E 及びオートラジオグラフィにより可視化した。C は、平衡密度遠心に続く別個の実験を示すものであり、該実験においては未変性免疫沈降を H B V コアの翻訳産物について実施した。本実験においては、H B V コアを 1 5 0 分にわたり翻訳させて、かつ前記と同様にスクロース勾配上で遠心分離した。スクロース勾配の中間層 (レーン 6 及び 7) からの物質をプールして、かつ C s C l 平衡勾配上で遠心分離した。分画 3 及び 6 を回収して、等量のアリコートに分割して、かつ未変性条件下で抗コア抗血清 (C)、非免疫性血清 (N) 又は抗 6 0 (6 0) の何れかを使用して免疫沈降した。オートラジオグラフィの露光時間は、組内の 3 つの各レーン (C、N、及び 6 0) については同一であり、但し組間では変動した。

30

40

【 0 0 3 4 】

図 2 2 は、未組立コアポリペプチドが多量体粒子内で追跡され得ることを示すものである。H B V コアの転写物を擬似転写物で 5 0 % ほど希釈して、かつ次いで 1 2 0 分にわたり翻訳させた。翻訳産物を 3 つのアリコートに分割した。1 つのアリコートを氷上に置いた (A)。第 2 のアリコートには、4 5 分にわたりインキュベートされた 1 0 0 % 転写物及び未標識アミノ酸のみを使用して作製された H B V コアポリペプチドの翻訳物を添加した。次いで、この混合物を更に 4 5 分 (B) 又は 1 2 0 分 (C) の何れかについてインキュベートした。第 3 のアリコートには、4 5 分にわたりインキュベートされた擬似転写物の翻訳物を添加して、かつこの混合物を更に 1 2 0 分 (D) にわたりインキュベートした。次いで、全 4 種の試料を上記と同様にスクロース勾配上で遠心分離し、かつ分画を採り

50

出して、かつ SDS - PAGE 及びオートラジオグラフィにより分析した。高濃度の（未標識）HBV コアポリペプチド鎖を添加すると、A に示される未組立コアポリペプチドは最初に沈殿層へ移動して、かつ次いで経時的に中間層へ移動することが（B 及び C、それぞれに）見出される。これに対して、擬似転写物を添加すると（D）、コアポリペプチドは勾配の最上層に残留する。

【0035】

図 23 は、完全キャプシドが単離された沈殿物から放出されることを示すものである。30 分にわたる HBV コアの転写物の翻訳に続いて、この翻訳産物を 0.01% の Nikkol 緩衝液中で希釈し、かつ 10 ~ 50% のスクロース勾配上で遠心分離した。上清を採り出して、かつ沈殿物を緩衝液中で再懸濁して、かつ等量のアリコートに分割した。1 つのアリコートにはアピラーゼを添加した一方で（A、上段）、対照物を緩衝液単独でインキュベートした（A、下段）。このインキュベーションを、25 で 90 分にわたり実施した。次いで、反応混合物を 10 ~ 50% の標準的なスクロース勾配上で遠心分離した。分画を SDS - PAGE 及びオートラジオグラフィにより分析した。別個の実験（B）においては、同様に沈殿物を単離して、かつ再懸濁した。1 つのアリコートにはコムギ胚抽出物及び未標識エネルギー混合物を添加して（B、上段）；第 2 のアリコートにはコムギ胚抽出物及びアピラーゼを添加した（B、下段）。この反応物を、25 で 180 分にわたりインキュベートし、かつ A についての記載と同様に遠心分離した。（コムギ胚抽出物を用いる又は用いることのない）アピラーゼ処理により、勾配の中間層に移動する放射能標識物質が放出された。この物質が完全キャプシドに相当することを、基準キャプシドを対照として用いて平衡 CsCl 勾配上での遠心分離により確認した（データ示さず）。これに対して、コムギ胚抽出物及びエネルギー混合物を用いる処理により、放射能標識物質が生成され、これは勾配の最上層及び中間層に移動した。これらの勾配の中間層中の物質が更に、完全キャプシドを含有することが、マーカーとしての基準キャプシドを用いる CsCl 上での遠心分離により示された。

【0036】

図 24 は、無細胞系で産生されたキャプシドの電子顕微鏡写真を示すものである。HBV コアの転写物の翻訳（無細胞）及び無関連なタンパク質の翻訳（NcoI で切断された GRP - 94、ここでは対照として言及するものとする）を 150 分にわたり実施して、かつこれらの産物及び組換えキャプシド（基準物）を別個の CsCl 勾配上で平衡に達するまで遠心分離した。各勾配の分画 6 を回収して、かつ更に Airfuge 機内で沈降させた。単純盲検法において、各々の沈殿物を回収して、再懸濁して、かつ EM のためにネガティブ染色により調製した。試料の同一性を、顕微鏡使用者により正確に判断した。対照試料中には、キャプシドに類似の粒子は見られなかった。バーは 34 nm。

【0037】

図 25 は、HCV コアの N 末端欠失突然変異体が無細胞系において組立てられないことを示すものである。

【0038】

発明の詳細な説明

本発明は、ウイルスキャプシドの翻訳及び組立の無細胞系を、たとえウイルス剤が不明及び/又は非天然であってもウイルス複製を阻害する潜在的な薬品標的物、及び薬品標的物と相互作用し、植物又は動物、特に哺乳動物、例えば家畜動物又は特にヒトにおけるウイルス感染の治療及び/又は予防における使用のための小分子を同定する手段として使用するものである。本発明は、全種のウイルスがコアを含有する核酸を包囲するタンパク質の殻（キャプシド）（完全なタンパク質 - 核酸複合体はヌクレオキャプシドである）を含有しているという事実と、今までのところ無細胞系で試験された全種のウイルスは、キャプシドの組立のために 1 種以上の宿主タンパク質又はシャペロンを必要とするという所見とに基づいている。従来は、幾つかの単純ウイルスはこれらの解離タンパク質成分から自発的に形成される一方で、他のウイルスは組立を開始するために酵素により触媒されるキャプソメアの改変を必要とすると考えられていた。しかしながら、無細胞翻訳系を使用す

る近年の研究（例えばPCT/US98/02350号を参照のこと）においては、HIVキャプシドの組立が1種以上のキャプシド組立中間体を介して進行することが示された。この所見は、目下他の無関連なウイルス、例えばHCVに及んでおり、かつこの情報及びHBVに関連する情報（リンガッパその他著、細胞生物学誌（1994年）125号：99～111頁（Lingappa et al., J Cell Biol (1994) 125: 99-111））は、ウイルスキャプシド構造が一般的に組立中間体の規則的順序で形成され、最終的な完全キャプシド構造がもたらされることを目下示唆している。これらの組立中間体は、コードされるウイルス性タンパク質及びシャペロンとして作用する宿主タンパク質を両方とも含有する複合体である。従って、多くのウイルスのキャプシドはタンパク質の組成が異なるが、宿主タンパク質を伴うウイルスの一般的なキャプシド形成経路は目下明白であり、かつ該経路を、キャプシドの組立プロセスを阻害する化合物のスクリーニング及び/又は無細胞系を使用してキャプシドの組立の間に見られる組立中間体を単離することにより不明のウイルス剤のための潜在的な薬剤目標物を同定する手段として使用することができる。本出願中では、3種のウイルス、HIV、HCV、HBVのための宿主細胞タンパク質、キャプシド組立経路、及び中間体を例示する。ウイルスそれぞれが異なり、かつキャプシドの組立に関与するとして同定される宿主タンパク質が異なるが、キャプシド組立経路はこれらの3種のウイルスに関しては同様である。研究されるウイルスは全く異なるものなので、同様の経路が他のウイルスによるキャプシド組立のために使用され、かつ本出願中に記載される中間体がそのような他のキャプシド組立経路において類似の相当物を有することが予想される。これらの相当物は、たとえウイルスそれぞれが不明であっても、以下に記載された一般的な操作を使用して同定することができる。

10

20

【0039】

潜在的な薬品標的物の同定方法においては、不明のウイルス剤由来のウイルス核酸をスクリーニングして、ウイルスキャプシド遺伝子をコードする核酸を、例えば既知のキャプシド遺伝子との配列ホモロジーにより同定する。次いで、この核酸を使用して転写物をインビトロで調製して、次いで該転写物を使用してウイルスキャプシド調製のための無細胞翻訳系を設定する；キャプシドの形成は、同定された核酸がキャプシド組立に必要なことの証拠である。キャプシド組立経路に関与するキャプシド組立中間体及びトランス作用性の宿主タンパク質を単離して、かつシーケンシングして、かつ次いで同定された宿主タンパク質とウイルスによりコードされるキャプシドタンパク質との相互作用を阻害する抗ウイルス化合物のスクリーニングに使用し、その際、例えば無細胞翻訳系を使用する。“キャプシド組立経路”という語は、最終的な完全キャプシド構造物の形成に必要な一連の組立中間体の順序的な流れを言及するものである。1つの組立中間体から次の中間体へと進行するために、中間体の1つ以上の特定の改変が起きる。“無細胞翻訳”という語は、全細胞から実質的に遊離された細胞抽出物を用いてインビトロで実施されるタンパク質合成を言及するものである。“無細胞翻訳混合物”又は“無細胞翻訳系”という語は、タンパク質翻訳を維持するのに十分な細胞の機構物及び成分、例えばトランスファーマRNA、リボソーム、少なくとも20種の種々のアミノ酸全部、ATP及び/又はGTPといったエネルギー源、及びエネルギー再生系、例えばクレアチンリン酸及びクレアチンホスホキナーゼを一般的に含有する無細胞抽出物を言及するものである。選択的に、キャプシド組立中間体を単離すること、例えば複合体を変性させて、かつ該複合体をこれらの成分であるコードされたウイルス性タンパク質と宿主タンパク質とに分離することにより、ウイルス感染治療のための抗ウイルス化合物を同定することができる。宿主タンパク質の1つ以上の生化学的特性、例えばウイルスキャプシドタンパク質に結合する宿主タンパク質領域のアミノ酸配列又はこの領域と結合する抗体の同定物と、複数種のウイルスキャプシド組立シャペロンの生化学的特性を有するライブラリーとを比較し、その際、該シャペロンは、このライブラリーの個々のメンバー及びウイルスキャプシドタンパク質の相互作用を阻害する1種以上の小分子とが個々に相互参照されている。次いで、宿主タンパク質と共通の生化学的特性を有するライブラリーの個々のメンバーと相互参照されている小分子を、不明の薬剤を伴う感染に関連する症状の治療剤として、又は不明の薬剤を伴う感染を

30

40

50

予防するために使用することができる。

【0040】

対象となる発明は、既存の技術を超える幾つかの利点を提供するものである。主要な利点は、無細胞系において、全種のウイルスの生活環において普遍的な段階であるキャプシドの形成を崩壊させて、各分類のウイルスに独自に関連する組立中間体を単離して、かつこの絶対的で定型化されたキャプシド組立経路に関与する1種以上の特徴的な宿主因子を同定することができるということである。追加的に、無細胞系は、キャプシド組立のためにウイルスそれ自体を伝播及び増殖させるのに必要な条件を考慮することなく、ウイルスがどの宿主タンパク質を利用するのかを決定すること、及びキャプシドの組立に関与するウイルスタンパク質をコードするウイルスの核酸のみを使用することによりいかなるウイルスの“脱構築”をも可能にするという利点を提供し、これにより研究所職員の感染性ウイルスへの暴露が回避される。細胞内で何が起きるかを、わずかにゆっくりと正確に再現するこの系において、組立中間体を検出及び富化することができる。本発明は、キャプシドの組立に関与する宿主タンパク質及びウイルスタンパク質を、たとえウイルス培養能が設定される前及び/又はウイルスが同定される前であっても同定することができ、かつ更に高力価のウイルスを産生する細胞培養系がないウイルスについても使用できるという利点を有している。

10

【0041】

ウイルスキャプシドのこの無細胞での組立法は、宿主因子の同一性に相関するライブラリーを製作できるという追加的な利点を有しており、該宿主因子は例えばこれらのアミノ酸配列、及び/又はこれらの宿主因子を使用する特定のウイルス又は特定のウイルス科についてのキャプシドの組立を阻害する任意の抗体のような特性を含み、かつ天然ウイルスについては、この情報をウイルス及び/又はウイルス科の同一性について更に相互参照することができる。宿主因子の特性と、特定の宿主タンパク質を使用するウイルスについてのキャプシドの組立を阻害する小分子に関する情報とを追加的に相互参照することができるので、宿主タンパク質を同定することにより更に治療剤の種類を同定できる。この系の追加的な利点は、たとえ遺伝的に改変されたウイルス及び/又は突然変異したウイルス及び/又は合成ウイルスであっても、これらのウイルスは依然として宿主タンパク質と相互作用してキャプシドを産生させるはずであるので、キャプシドの組立に必要な宿主ウイルスタンパク質のウイルスタンパク質結合部位は保存されているであろうから、組立中間体中の宿主タンパク質を同定することにより、その同定に基づいて治療剤の種類を決定することができるということである。このことは、抗体に対するエピトープが改変されており、かつウイルスがもはや既存の抗体により認識されないか、又は特定のウイルスに対する抗体が存在しない場合に特に有用である。

20

30

【0042】

宿主タンパク質及び組立中間体は、両方とも抗ウイルス標的物の候補である。このように、対象となる発明の別の利点は、組立中間体を単離することができ、かつ該中間体を、ある中間体から次の中間体への進行を妨害する薬品（例えば、ポリペプチド又は抗体）又はワクチンの設計、キャプシド形成に関与する宿主細胞の機構物を阻害することにより作用する薬品の設計、及びウイルスそれ自体の同定に関する情報の不存在下でさえキャプシド形成を阻害する薬品の作用の効率及び機構を試験する分析系の設計に使用することができるということである。追加的に、抗ウイルス薬剤についての標的物がウイルスタンパク質ではなく宿主タンパク質であれば、かかる薬剤に対するウイルス耐性の発生の可能性が減少する。対象となる発明の別の利点は、ゲノムの核酸断片を、無細胞系で産生されたキャプシド内にそのような核酸を系に添加することにより、キャプシドへ包み込むことができるということである。本発明のこの特徴は、キャプシドの包み込みを妨害する薬品を設計するために使用することができるか、又はキャプシドの包み込みを妨害する薬品の作用機構を試験する分析系の設計に使用することができることである。

40

【0043】

ウイルスキャプシド組立中間体を産生させるために、無細胞翻訳系を使用する。多くの

50

インビトロ翻訳系が公知技術であり、基本的な必需品は十分に研究されている（エリックソン及びブローベル著、酵素学研究法（1983年）96号：38～50頁（Erickson and Blobel, Method Enzymol (1983)96:38-50）；マーリック、W. C. 著、酵素学研究法（1983年）101号：606～615頁（Merrick, W. C., Method Enzymol.(1983)101:606-615）；スピリンその他著、サイエンス誌（1998年）242号：1162～1164頁（Spirin et al. Science (1998) 242:1162-1164））。例は、例えば Promega 社（マディソン、ウィスコンシン）のようなメーカーから市販されているコムギ胚抽出物又はウサギ網状赤血球抽出物、若しくはそのような抽出物から形成された高速上清である。無細胞翻訳混合物は、キャプシドの組立の必須成分を含有する公知技術の多くの任意の細胞型から誘導することができる一方で、本発明は種々の株のコムギ胚から調製された無細胞用コムギ胚抽出物を使用して例示している。（エリックソン及びブローベル著（1983年）酵素学研究法96号：38～50頁（Erickson and Blobel, (1983)Method Enzymol 96:38-50））。例えば、HIVキャプシド形成に必要な無細胞抽出物成分は、例えば23c抗体に結合するタンパク質である；ウサギ網状赤血球抽出物は、宿主因子68（HP68.）が添加されない場合にはHIVキャプシドの産生を維持しない。従って、ウイルスがこれに関わるかどうかに応じて、幾つかの場合において、キャプシド中間体の組立を促進する外因性タンパク質、例えば宿主タンパク質を無細胞系に補給することが必要なことがある。特定のウイルスのための外因性タンパク質の添加の必要性は、経験的に判断することができる。この抽出物は、翻訳に必要なことが知られている因子、更に依然として明らかにされておらず、かつ組立に必要であろう因子の源である。これらの抽出物が、タンパク質が標的とされることがある原形質膜及び小胞体（ER）から誘導された膜小胞の混合物を含有する一方で、輸送能を有するER小胞は、一般的に抽出物中で相当量では存在しないので、通常、外因性膜、例えばイヌ臍臓膜を添加することにより補給する。本出願に示すように、これらのキャプシド組立系は、インビボで生ずるキャプシドの事象を厳密に再現するものである（更に、モーラその他著（1991年）サイエンス誌254号、1647～1651年（Molla et al., (1991) Science 254, 1647-51）及びモーラその他著（1993年）生物学的水準の発展78号、39～53号（Molla et al., (1993) Dev Biol Stand 78, 39-53）を参照のこと）。

10

20

30

40

50

【0044】

HCV、HBV、HIV-1、M-PMV及び他のキャプシドを作製するのに使用されている無細胞組立系の成分は、類似点と、ビリオン形態形成における相違点を反映する相違点を有する。例として、幾つかのウイルス、例えばHIVは、ミリストイル化された中間物を有するので、不明のウイルスがこの成分を必要とするウイルスであれば、十分なミリストイル補酵素A（MCoA）を系に添加してキャプシドの組立を可能にする必要がある。無細胞翻訳混合物に補給するために使用されるミリストイル補酵素Aの量は、キャプシド形成を維持するのに十分な量である。必要とされる濃度は特定の実験条件により変動する一方で、本発明の支援により実施された実験においては、約0.1 μM～約100 μM、かつ好ましくは約5 μM～約30 μMの濃度がHIVキャプシド形成を維持することが判明した。

【0045】

幾つかのウイルスはキャプシドの組立のために膜タンパク質を必要とするので、適切な膜を、無細胞翻訳混合物、例えば以下に記載される界面活性剤感受性の分画、界面活性剤非感受性の分画及び宿主タンパク質の分画に添加してよく、又は該混合物にそのような分画を補給してよい。例としてHIVについては、無細胞翻訳混合物中に存在する膜を界面活性剤の添加により可溶化する際、HIVキャプシドの組立は、臨界ミセル濃度を上回る界面活性剤の添加には感受性を有するが、臨界ミセル濃度を下回る界面活性剤の添加には感受性を有さない。この観察は、キャプシドの組立の特定の段階で必要とされている膜の役割と一致するものである。更に、HIVキャプシドの組立は、スクロース勾配中で90Sを上回る沈降価を有する細胞成分の存在により改善され、かつ該組立は少なくとも0.5%の“NIKKOL”を用いる抽出には非感受性である。“界面活性剤感受性の分画”

という語は、エリックソン及びブローベル(1983年)(Erickson and Blibel)(1983)により記載された方法(酵素学研究法96巻(Method in Enzymology Vol 96))により調製された標準的なコムギ胚抽出物中に存在する脂質二重層膜をおそらく含有する成分を言及するものであり、該成分は、0.1質量%濃度の“N I K K O L”を抽出物に添加する際にH I Vキャプシドの組立の維持に関して不活化される。そのような界面活性剤感受性因子は同様に調製された他の細胞の抽出物中に存在してよく、又は該因子を別個の細胞抽出物から独立して調製し、かつ次いで無細胞翻訳系に添加してよいことが認識されている。

【0046】

ミリストイル化の機構物及び膜は、両方ともH I Vのようなウイルスのための無細胞系に存在するはずである一方で、これらはH B V又はH C Vのようなウイルスのキャプシドの組立には必要とされない。それというのも、構造タンパク質がミリストイル化されることなく、かつ膜への標的化がキャプシドの組立後に生ずると考えられるからであり、その一方で無細胞翻訳系のこれらの成分の存在は、これらを必要としないウイルスについてはウイルスキャプシドの組立に負の影響を及ぼさないので、これらの成分は不明のウイルスのキャプシドを作製するための無細胞系に含まれていてよい。

10

【0047】

公知技術の方法は、無細胞系においてタンパク質合成を維持するのに十分なエネルギーレベルを維持するために、例えば追加的なヌクレオチドエネルギー源を反応の間に添加するか、又はクレアチンリン酸/クレアチンホスホキナーゼのようなエネルギー源を添加することにより使用する。標準的な翻訳混合物中に存在するA T P及びG T Pの濃度は一般的に約0.1mM~約10mM、特に好ましくは約0.5mM~約2mMであり、該濃度は追加的なエネルギー投入を必要とすることがあるタンパク質合成及びキャプシド形成を両方とも維持するには十分である。一般的に、本発明により調製される反応混合物は、十分な量のA T P及び/又はG T Pを用いて力価を設定して、系において約10ピコモル濃度のウイルスタンパク質の産生を維持させることができる。

20

【0048】

無細胞系における未熟キャプシドの組立は、キャプシドの組立に関与する1種又は複数種の特定のウイルスタンパク質のみの発現を必要とする。不明ウイルス又は不明ウイルスに感染した個体の体液を含有する試料、若しくは個体からの感染細胞を、このウイルスについての1種又は複数種のキャプシドタンパク質をコードするウイルス核酸の源として使用する。この流体物は、任意の体液、例えば血液、血清、血漿、リンパ液、尿、痰、脳脊髄液、又は化膿物の検体でよい。多くの既知ウイルス、例えばエボラ、痘瘡、及びベネズエラ脳炎ウイルスのゲノムがシーケンシングされている、例えば<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Genome>、<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Genome>>を参照のこと。不明のウイルス又はゲノムがシーケンシングされていないウイルスについては、ウイルスゲノムをクローニングして、かつシーケンシングして、かつキャプシド遺伝子を既知のウイルスキャプシド遺伝子との配列ホモロジーにより同定する。

30

【0049】

キャプシドの組立に関与するウイルスタンパク質をコードする核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)を使用する増幅により得ることができる。必要な核酸配列を包含するプライマーの組は、全種の既知のウイルスのキャプシドタンパク質をコードする核酸の配列データに基づいて、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方について設計する。不明のウイルスのコーディング配列は既知の配列と同一でないことがあるが、キャプシドの組立に関与するウイルスタンパク質をコードすることが知られている既知の配列とおそらく関連しているので、コンセンサスについて縮重のハイブリッドオリゴヌクレオチドプライマーを使用する(例えば、ローズその他著、核酸研究(1998年)26号:1628~1635頁(Rose et al., Nucleic Acid Research (1998) 26: 1628-1635)を参照のこと、該文献は参照をもって開示されたものとする)。

40

50

【0050】

キャプシド組立系（図1を参照のこと）においては、無細胞翻訳混合物をインビトロで合成された不明のウイルスのキャプシド転写物を用いて設定する。“用いて設定する”という語は、ウイルスキャプシドタンパク質をコードするmRNAを無細胞翻訳混合物中に添加することを意味している。好適なmRNA調製物は、例えばインビトロでmMESSSAGEmMACHINEキット（Albion社製）を使用して産生されキャッピングされたRNA転写物である。また、RNA分子は、翻訳反応に使用される同一の反応容器内で、SP6又はT7ポリメラーゼをウイルスキャプシドタンパク質コーディング領域又はcDNAと一緒に反応混合物に添加することにより生成させてもよい。

【0051】

キャプシドを産生させるのに十分な時間にわたるインキュベーションの後に、無細胞反応産物を分析して、（粒子の大きさ及び形状を評価するものである）沈降（S）価、（粒子密度を示すものである）浮遊密度及び電子顕微鏡像を決定した。これらは一緒に、キャプシド形成の完全性についての感度の良い測定の一組となる。更に、第4の基準（プロテアーゼ消化に対する耐性）を使用してもよい。得られたエンベロープを伴わない粒子が所望のウイルスキャプシドに相当することを確認するために、速度沈降勾配からのエンベロープを伴わないキャプシドを含有する分画をCsCl上での平衡遠心により分析して、かつ感染細胞内で産生された（エンベロープを有さない）キャプシドの分画とそのようなものが利用可能であれば浮遊密度を比較する。キャプシドの産生は、同定されたウイルス核酸がキャプシドタンパク質をコードすることの確認となる。

【0052】

上記の無細胞キャプシド組立反応は、ゲノム核酸又はその断片をキャプシド組立反応の間に添加することにより、核酸のパッケージングを含むところまで拡大することができる。この添加及びキャプシドの包み込みのモニタリングは、本発明による薬品スクリーニング分析に活用することができる粒子形成の追加的なパラメータを提供する。好ましい核酸は、長さが約1000ヌクレオチドを上回るものであり、かつ該核酸を転写ベクター中にサブクロニングする。次いで、相応のRNA分子をインビボでの標準的な転写手順により産生させる。この分子を、上記の反応混合物にインキュベーション時間の開始時に添加する。混合物中に存在するRNA分子の最終濃度は変動するとは言え、反応混合物にそのような分子が添加される容量は全容量の約10%を下回るのが望ましい。

【0053】

キャプシド組立中間体は、多くの方法、例えば無細胞組立系においてキャプシド産生を特異的な組立遮断薬（例えば、ATPを遮断するアピラーゼ）の添加により遮断するか、又は重要成分、例えばミリストイルCoA（これを必要とするウイルスについては）を反応物から取り去ることにより形成させることができる。このように、1種以上の組立中間体を大量に産生させる。次いで、この組立中間体を分析して、一般的に少なくとも1種以上の宿主細胞由来の組立タンパク質又はシャペロンを含有する複合体の成分を決定する。そのようなタンパク質の存在は、多くの任意の手段、例えば宿主タンパク質-組立中間体複合体の免疫沈降により検出し、その際、既知の宿主細胞のシャペロンに結合する抗体を使用する。宿主タンパク質と組立中間複合体とは、例えば変性により分離して、かつ宿主細胞タンパク質の生化学的特性を測定する。プロファイルされた生化学的特性は、例えばファージディスプレイライブラリーのスクリーニング及びタンパク質のシークエンシングにより既知のウイルス用シャペロンに対するモノクローナル抗体との免疫識別反応性である。この配列を評価して、これが既知のウイルス用シャペロン由来のアミノ酸配列を含有するかどうか、及び宿主タンパク質のホモログ、例えばコムギ胚又は霊長類、特にヒトのホモログが存在するかどうかを判断する。ヒトホモログは、同定された配列に対する縮重プライマーを使用して同定するか、又はキャプシド組立中間体に結合する他のシャペロンタンパク質は無細胞系において同定することができ、かつこれらを次いで発現ベクター中にクロニングすることができる。これらの発現ベクターからの翻訳産物を無細胞系において評価して、これらのキャプシド組立タンパク質との結合能を免疫沈降により判断する

10

20

30

40

50

。このタンパク質は、例えば SDS-PAGE により評価して分子量により更に特性決定する。

【0054】

宿主タンパク質に対するモノクローナル抗体が市販されていなければ、これらを当業者に知られている数多くの方法又は事前に記載された方法（例えば、コーラーその他著、ネイチャー誌 256 号：495～497 頁（1975 年）（Kohler et al., Nature, 256: 495-497(1975)）及び欧州免疫学誌 6 号：511～519 頁（1976 年）（Eur. J. Immunol. 6: 511-519(1976)）；ミルSTEINその他著、ネイチャー誌 266 号：550～552 頁（1977 年）（Milstein et al., Nature 266: 550-552 (1977)）、コプロウスキーその他（Koprowski et al）著、米国特許第 4 172 124 号；ハーロー、E. 及び D. レイン著、1998 年、抗体：実験室用取扱説明書（コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク（1989 年）（Harlow, E. and D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)）；分子生物学最新プロトコール 2 巻（94 年夏の増刊 27 号）（Current Protocols In Molecular Biology, Vol.2 (Supplement 27, Summer '94)、オースベル、F. M. その他編（ジョンワイリーアンドサンズ社：ニューヨーク）11 章（1991 年）Ausubel, F.M. et al., Eds., (John Wiley & Sons: New York, N.Y.), Chapter 11, (1991)）を参照のこと）により調製する。一般的に、好適な不死化細胞系（例えば、ミエロマ細胞系）と抗体産生細胞（例えば、目的の抗原で免疫された動物の脾臓又はリンパ節由来のリンパ球）とを融合することによりハイブリドマを産生させる。免疫系細胞とリンパ細胞との融合から得られた細胞は一般的にハイブリドマと言及され、該細胞を選択的な培養条件を使用して単離して、かつ次いで限界希釈によりクローン化することができる。所望の結合特性を有する抗体を産生する細胞は、好適な分析、例えば血清学的分析、例えば固定酵素免疫測定分析（ELISA）により選択する。

10

20

【0055】

また、モノクローナル抗体の機能的結合断片を、例えば酵素的切断又は組換え技術により産生させることもできる。酵素的切断法は、例えば Fab 又は F(ab')₂ 断片をそれぞれ生成させるパイン又はペプシン切断である。また、1つ以上の停止コドンが天然の停止部位の上流に導入されている抗体遺伝子を使用して抗体を種々の切断形態で産生させることもできる。例えば、F(ab')₂ 重鎖部分をコードするキメラ遺伝子を、重鎖の CH₁ ドメイン及びヒンジ領域をコードする DNA 配列を含有するように設計することができる。モノクローナル抗体の機能的断片は、これらが誘導される全長抗体の少なくとも1つの結合機能及び/又は調節機能を保持する。好ましい機能的断片は、相応の全長抗体の抗原結合部位を保持する（例えば、宿主タンパク質のエピトープとの結合能を保持する）。別の実施態様においては、機能的断片は宿主タンパク質の1つ以上の機能的特性、例えば結合活性の阻害能を保持する。

30

【0056】

また抗体を、宿主タンパク質の機能的遺伝子を欠くノックアウトマウスを使用して産生させることができる。ノックアウトマウスは、当業者に知られている標準的技術を使用して作製することができる（カペッチ著、サイエンス誌（1989 年）244 号：1288 頁（Capecchi, Science (1989) 244: 1288）；コーラーその他著、免疫免疫学研究年鑑（1992 年）10 号：705～730 頁（Koller et al. Annu Rev Immunol (1992) 10:705-340）； Deng et al. Arch Neurol (2000) 57:1695-1702）。ノックアウトされるべき遺伝子断片を含有する他に、一般的に抗生物質耐性遺伝子、好ましくはネオマイシン耐性遺伝子を含有するターゲティングベクターを構築して、相同組換え及びウイルスチミジンキナーゼ（TK）遺伝子に基づいて選択する。選択的に、ジフテリア毒素（DTA）をコードする遺伝子を使用して、ランダムな挿入に対して選択することができる。このベクターは、相同組換えが生ずればネオマイシン耐性遺伝子はゲノム中に組込まれるが、TK 又は DTA

40

50

遺伝子は常に失われるように設計する。マウスの胚幹 (E S) 細胞を線状化されたターゲットベクターを用いてトランスフェクションして、相同組換えを介して該細胞はノックアウトされるべき標的の遺伝子座で組換えられる。マウス E S 細胞をネオマイシンと、ガンシクロビル (T K 用)、即ち T K により代謝される薬品との存在下で増殖させて、致死産物を作製する。従って、相同組換えを受けた細胞はネオマイシン及びガンシクロビルの両方に耐性を有する。D T A を含有するベクターは、その遺伝子をコードするいかなる細胞をも死滅させるので、細胞培養培地中で追加的な薬品を必要としない。当業者によく知られている技術であるサザンブロッティングハイブリダイゼーション及び P C R を使用して、相同組換えの事象を確かめる。

【 0 0 5 7 】

標的遺伝子が破壊されたマウスを作製するために、ポジティブな E S 細胞を培養液中で増殖させ、分化させて、かつ得られた芽細胞を偽妊娠雌に移植する。選択的に、E S 細胞を移植前のマウス胚の胞胚腔中に注入して戻して、かつ次いでこの胚細胞を外科的に移植する。キメラの子孫を容易に同定することができるように、トランスフェクションされる E S 細胞と被移植体の胚細胞とは、異なる毛色のマウス由来の細胞であってよい。交配技術を介して、ホモ接合体のノックアウトマウスを作製する。これらのマウス由来の組織を、例えば P C R 及びサザンブロッティングハイブリダイゼーションを使用し評価して、標的遺伝子についてのホモ接合体ノックアウトを確かめる。

【 0 0 5 8 】

代替法においては、アンチセンス技術を使用する遺伝子ターゲティングを使用することができる (パーゴットその他著、J B C (2 0 0 0 年) 2 7 5 号 : 1 7 6 0 5 ~ 1 7 6 1 0 頁 (Bergot et al., JBC (2000) 275: 17605-17610))。ホモ接合体のノックアウトマウスを、精製宿主タンパク質ペプチド、即ち未変性及び変性の組換えタンパク質を両方とも用いて免疫する。続いて 3 週目及び 6 週目に免疫原を用いてブースターした後に、マウスを屠殺してかつ脾臓を摘出して、かつ該脾臓とミエローマ細胞との融合を実施する (コースその他著、酵素学研究法 (1 9 9 9 年) 3 0 9 号 : 1 0 6 頁 (Korth et al. Methods in Enzymol. (1999) 309: 106))。個々のハイブリドーマ由来の抗体を、立体配座の特異性についてスクリーニングする、即ちそれは単一の配座異性体に対する実質的な特異性と結びついている。このスクリーニング工程は、ある配座異性体を別の配座異性体に対して富化するために選択された無細胞翻訳系又は放射能標識培地中で産生された放射能標識タンパク質産物若しくは細胞抽出物を用いて実施する。これらの産物をハイブリドーマの上清を使用して免疫沈降させて、かつ S D S - P A G E ゲル上を走行させる。好ましくは無細胞抽出物を使用する。それというのも、トランスフェクションされた細胞を使用するとタンパク質 - タンパク質相互作用がもたらされ、該作用により抗体の特異的なエピトープへの結合が遮断されるので潜在的な配座異性体が隠蔽されるという可能性のためである。放射能標識され、(例えば、ウイルス感染により) その立体配座がゆがんだ翻訳産物を用いる免疫沈降スクリーニングの使用は、このスクリーニングとモノクローナル抗体産生の慣用の研究法とを区別する鍵である。スクリーニングのために 9 6 ウエルプレートを使用することはこの工程を合理化し、このことは一人の技術者が一日で何百という個々のハイブリドーマに至るまでスクリーニングするのを可能にする。) また、上記手順を使用して、キャプシドタンパク質に対する抗体、及び組立中間体に対する抗体を調製することもできる。

【 0 0 5 9 】

宿主タンパク質上のウイルスキャプシドタンパク質結合部位及び/又はウイルスキャプシドタンパク質上の宿主タンパク質結合部位に対する抗体は、特に重要である。宿主タンパク質に対する既知の抗体は、例えば t 複合体ポリペプチド 1 (T C P - 1) に対する抗体である (ウイリソンその他著 (1 9 8 9 年) セル誌 5 7 号 : 6 2 1 ~ 6 3 2 頁 (Willis on et al, (1989) Cell, 57: 621-632) を参照のこと)。T C P - 1 上の種々のエピトープを認識し、かつ更に H I V - 1、H C V、H B V 及び N - M P V 上のエピトープをも認識する幾つかの抗体が調製された (実施例 1 9 を参照のこと)。M - P M V のマトリック

10

20

30

40

50

ス組立 (M A) ドメインに対する抗体はキャプシドの組立を阻害すると報告されているので、該抗体はキャプシドの組立に關与する宿主タンパク質及び / 又はウイルスキャプシドタンパク質の何れにも結合することができる。キャプシド組立中間体中におけるキャプシドタンパク質と宿主タンパク質との間の結合は、B i a c o r e A B 社 (www.biacore.com) により開発された技術を使用して分析することができ、かつ結合部位を同定することができる。

【0060】

無細胞系を使用してウイルスキャプシドの産生に必要なキャプシド組立中間体の形成を阻害すると考えられる化合物を同定することができ、次いで該化合物をウイルス複製阻害能に基づいてスクリーニングすることができる。目的の化合物の同定については、この化合物をヒト細胞内で同様の条件下で評価する。この分析は、多くの任意の形式により調整することができる。2種の異なる分析型を、単独又はこれらの組合せの何れかを使用することができる。ウイルスキャプシド形成を遮断する又は損傷させる化合物をスクリーニングするために、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を直接的に使用する。化合物のリード候補のハイスループットスクリーニングは、当業者に知られている種々の任意の技術を使用して、例えばウイルスキャプシドタンパク質と宿主タンパク質との間に見られる結合についての阻害及び / 又は反転の特徴的な免疫蛍光パターンに基づくスクリーニングにより実施することができる。次いでこれらのリード化合物を、更に特異性について評価する。そのような別の分析においては、無細胞翻訳及び組立を液相中において薬剤候補の存在下又は不存在下で実施する。次いでこの反応生成物を、無細胞翻訳系を使用してもともと同定されている1種以上のウイルスキャプシド組立中間体又は完全ウイルスキャプシドについて特異的な抗体で被覆された固相のイムノキャプチャー部位に添加する。このように薬品の組立妨害の正確な程度を決定する。最初にリード化合物を、キャプシドの組立に關与する活性部位とおそらく結合する化合物についてデータベースで調査することに基づいて同定することができ、次いで無細胞系においてキャプシド形成の阻害について評価する。そのような情報を使用して、ウイルス複製の種々の側面を標的とすることによりウイルス感染に対する潜在的な治療又は組合せ療法を同定することができる。

10

20

【0061】

次いで、無細胞系において組立中間体及び / 又は宿主タンパク質上の活性部位に結合することによりウイルスキャプシド形成を遮断することが判明した化合物を、不明のウイルスに感染された哺乳動物細胞内で評価する。好ましくは、化合物を毒性、例えば宿主のストレス反応、例えば熱ショックタンパク質 (HSP) 70、80、90、94又はカスパーゼの活性化に基づいて更にスクリーニングする (フロレスその他著、神経科学誌 (2000年) 20号: 7622 ~ 7630頁 (Flores et al., J. Neuroscience (2000) 20: 7622-30))。これらのタンパク質活性の評価方法は、当業者によく知られている。

30

【0062】

無細胞翻訳 / 組立系を使用して、大量の野生型ウイルスキャプシド、キャプシド中間体又はキャプシド突然変異体を産生させて、例えばワクチン産生に使用することができる。更にこの系を、無細胞翻訳系でのキャプシド形成又はキャプシド中間体の形成の阻害能に基づいて選択された化合物を細胞に添加することによりキャプシド形成を阻害する化合物を同定する手段として使用することもできる。エンベロープウイルスについては、無細胞系を、全ウイルスゲノムをコードし、但しエンベロープタンパク質を除くプラスミドを用いて使用することができる。このように、本発明はウイルスの核ゲノム又はその断片をキャプシドへ包み込む方法を含む。ウイルス核酸をコードするゲノム核酸又は断片若しくはプラスミドをそのような系に添加して、反応工程の間にキャプシドへ包み込む。産生されたs抗体は、ウイルスキャプシド形成の状態を評価するスクリーニング分析又はウイルスキャプシド形成を妨害する薬品のスクリーニングに使用される分析における試薬として有益であることが判明し、かつ更にウイルス感染を惹起するウイルスの同一性の判断のための診断剤として使用することができる。ウイルスキャプシドタンパク質に対する抗体の可変領域をコードする遺伝子を、不明のウイルスの標的である細胞を形質導入するのに適切

40

50

なベクター中に挿入することができ、かつこの細胞を形質導入させてウイルスキャプシドタンパク質に対する細胞内発現抗体を発現させることができる。例えば、ゴンカルベスその他著(2002年)生化学誌35号:32036~32045頁(Goncalves et al (2002) J. Biol. Chem. 35: 32036-32045)を参照のこと、該文献は細胞内免疫化によるHIV-1 Vifタンパク質の機能的な中和及びその結果のウイルス複製の阻害を記載している。

【0063】

多くのウイルス又はウイルス科と会合する宿主タンパク質及び/又は組立中間体を検出及び特性決定することにより、種々の宿主タンパク質及び/又は組立中間体のライブラリーであって、該ライブラリーのメンバーが個々のウイルス又はウイルス科であるライブラリーを製作することができる。各メンバーは、そのウイルス又はウイルス科についての宿主タンパク質及び/又は組立中間体の生化学的特性と相互参照されている。この特性は、例えば1種又は複数種の宿主タンパク質のアミノ酸配列、1種又は複数種の宿主タンパク質及び/又は組立中間体に結合し、かつ好ましくはキャプシドの組立を阻害する抗体、ウイルスキャプシドの核酸配列、これらの遺伝子を増幅するのに有用なPCRプライマーの組、無細胞翻訳系を使用して産生されるウイルスキャプシドの物理化学的特性、例えば沈降係数、浮遊密度又は電子顕微鏡を使用しての像、若しくはキャプシドの組立を阻害する任意の小分子である。不明のウイルスとライブラリーのメンバーとの間に少なくとも実質的な類似性が存在する場合には、このライブラリーを使用して最終的な疾患診断を決定することができる。

【0064】

不明ウイルスに感染した個体の治療プロトコルを、たとえウイルスの正体が不明であるか又は不明のウイルスとライブラリーのメンバーとの間の共通の特性が、キャプシドの組立の間に1種又は複数種のウイルスタンパク質へ結合することに関与する宿主タンパク質又はその一部にすぎなくとも、感染個体のために同定することができる。例として、評価化合物を有する無細胞系において不明ウイルスのキャプシド産生が阻害されることは、この評価化合物をウイルスに対する治療剤として使用できることの指標である。無細胞系を使用して同定された宿主タンパク質及び/又は組立中間体を、他のウイルスにおいてキャプシドの組立に関連する宿主タンパク質及び/又は組立中間体のライブラリーのメンバーに対する抗体又はその機能的断片を含有するパネルを使用してスクリーニングすることができる。好ましくは、このパネルは固体支持部上に固定する。一般的には、宿主タンパク質又は組立中間体に特異的な抗体は、モノクローナル抗体又はその断片である。モノクローナル抗体又は結合断片は、検出可能な標識、例えば放射能標識又は酵素標識を用いて標識する。抗体に結合させることができる酵素標識の例は、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、又はウレアーゼであり、かつ酵素と抗体との結合方法はよく知られている技術である。標識は、当業者によく知られた方法、例えばラジオグラフィ、又は血清学的方法、例えばELISA又はプロットティング法を使用して検出することができる。標識の存在は、ライブラリーのメンバーとエピトープを共有し、キャプシドの組立に関与する少なくとも1種のタンパク質又は組立中間体が存在することの指標である。メンバーの生化学的特性が、例えばキャプシドの組立に関与する宿主タンパク質とウイルスタンパク質との間の結合を妨害することによりキャプシドの組立を阻害する手段に関する情報であれば、そのような手段は不明ウイルスのキャプシド組立を阻害する点で有効である。

【0065】

以下に実施例を説明するが、該実施例は本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0066】

実施例

材料

1. 薬品

10

20

30

40

50

薬品の出所は、特に記載が無い限り、以下のとおりである：Nonidet P40 (NP40)を、Sigma Chemical Co.社(セントルイス, ミズーリ)から入手した。“NIKKOL”を、Nikko Chemicals Ltd.社(東京, 日本)から入手した。コムギ胚を、General Mills社(バレージョ, カリフォルニア)から入手した。ミリストイル補酵素A(MCoA)を、Sigma Chemical Co.社(セントルイス, ミズーリ)から入手した。

【0067】

2. プラスミド構築

無細胞転写のための全種のプラスミドの構築を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)及び他の標準的な核酸技術を使用して実施した(サムブルーク, J. その他著、分子クローニング 実験室用取扱説明書(Sambrook, J., et al., in Molecular Cloning. A Laboratory Manual))。プラスミドベクターを、アフリカツメガエルグロビンの5'非翻訳領域が、HindIII部位で挿入されているSP64(Promega社製)から誘導した(メルトン, D. A. その他著、核酸研究12号: 7035~7056頁(1984年))(Melton, D.A., et al., Nucleic Acids Res. 12: 7035-7056(1984))。HIVゲノムDNA(ジェイレビ氏(Jay Levy); (カリフォルニア大学、サンフランシスコ)からの寄贈品)由来のgagのオープンリーディングフレーム(ORF)をSP6プロモーター及びグロビン非翻訳領域の下流に導入した。GA突然変異を、PCRを使用してGagの2番目の位置のグリシンをアラニンに置換することにより実施した(ガットリンガー, H. G. その他著、国立科学学士院の進展86号: 5781~5785頁(1989年))(Gottlinger, H.G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:5781-5785(1989))。Pr46突然変異体を、435番目のグリシンの後に停止コドンを導入することにより作製した(p6の除去); pr41は、(p24のC末端領域中において)361番目のアルギニンの後に停止コドンを有する。これらの切断突然変異体は、ジャウエット, J. B. M. その他著、一般ウイルス学誌73号: 3079~3086頁(1992年))(Jowett, J. B.M., et al., J. Gen. Virol. 73: 3079-3086(1992))により記載された突然変異体と同種であり、これらは参照をもって開示されたものとする。D2突然変異体を作製するために、250番目のグリシンから260番目のバリンまでのアミノ酸を欠失させた(ホックレイ, D. J. その他著、一般ウイルス学誌75号: 2985~2997頁(1994年))(Hockley, D.J. et al., J. Gen. Virol. 75:2985-2997(1994)); チャオ, Y. その他著、ウイルス学199号: 403~408頁(1994年))(Zhao, Y., et al., Virology 199:403-408(1994))と同様)。PCRにより処理された全ての改変を、DNAシーケンシングにより確かめた。HIV-1全ゲノムをコードし、但しエンベロープを欠失するプラスミドpBRUenvを作製して、かつ事前の記載と同様に使用した(キンプトンその他著、ウイルス学誌(1992年)66号: 2232~2239頁(Kimpton et al. J.Virology (1992) 66: 2232-9))。プラスミドWGHP68-Tr1は、第2のヌクレオチド結合ドメインの前に停止コドンを有するHP68の379個のアミノ酸切断形態物をコードする(図6、矢印)。このプラスミドは、WGHP68のN末端の3分の2をコードし、かつ細胞内にトランスフェクションされた際には予想される43kDタンパク質を産生させる(図7)。

【0068】

3. ³⁵Sエネルギー混合物

³⁵Sエネルギー混合物(5×原液)は、5mMのATP(Boehringer Mannheim社製)、5mMのGTP(Boehringer Mannheim社製)、60mMのクレアチンリン酸(Boehringer Mannheim社製)、メチオニンを除いた19種のアミノ酸混合物(メチオニンを除く各アミノ酸; 各々は0.2mM)、1ミリキュリーの³⁵Sメチオニン(ICN社製)を、2Mのトリス塩基と共に200マイクロリットル容量中にpH7.6で含有する。

【0069】

4. 調節緩衝液

10

20

30

40

50

調節緩衝液 (10×) は、40 mM のヘベス - KOH pH 7.6 (U.S. Biochemicals 社製)、1.2 M の酢酸カリウム (Sigma Chemical Co. 社製)、及び 2 mM の EDTA (Mallinckrodt Chemicals 社 (パリス, ケンタッキー) 製) を含有する。

【0070】

実施例 1

無細胞タンパク質合成

1. インビトロ転写

Gag コーディング領域を含有するプラスミドを、EcoRI 部位で線状化した (NEB の目録中の記載と同様)。線状化されたプラスミドを、フェノール - クロロホルム抽出により精製して (サンプルク, J. その他著、分子クローニング 実験室用取扱説明書 (Sambrook, J., et al., in Molecular Cloning. A Laboratory Manual) の記載と同様)、かつこのプラスミドを 2.0 mg/ml の DNA 濃度に調整した。転写を、反応物: 40 mM のトリス酢酸 (7.5)、6 mM の酢酸 Mg、2 mM のスペルミジン、0.5 mM の ATP、0.5 mM の CTP、0.5 mM の UTP、0.1 mM の GTP、0.5 mM のジグアノシントリホスフェート (diguanosine triphosphate) (cap)、10 mM のジチオトレイトール、0.2 mg/ml のトランスファー RNA (Sigma Chemical Co. 社製)、0.8 単位/マイクロリットルの RNアーゼ阻害剤 (Promega 社製)、1 µl につき 0.4 単位の SP6 ポリメラーゼ (NEB 社製) を含有する反応物を使用して実施した。突然変異体 DNA を、ガットリンガー, H.G. その他著、国立科学学術院の進展 86 号: 5781 ~ 5785 頁 (1989 年) (Gottlinger, H.G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 5781-5785(1989)); ジャウエット, J.B.M. その他著、一般ウイルス学誌 73 号: 3079 ~ 3086 頁 (1992 年) (Jowett, J.B.M., et al., J. Gen. Virol. 73: 3079-3086(1992)); ホックレイ, D.J. その他著、一般ウイルス学誌 75 号: 2985 ~ 2997 頁 (1994 年) (Hockley, D.J. et al., J. Gen. Virol. 75: 2985-2997(1994)); 又はチャオ, Y. その他著、ウイルス学 199 号: 403 ~ 408 頁 (1994 年) (Zhao, Y., et al., Virology 199: 403-408(1994)) による記載と同様に調製した; これらの出版物は参照をもって開示されたものとする。

【0071】

2. 無細胞翻訳系

転写産物の翻訳を、コムギ胚抽出物を用いて ³⁵S メチオニン (ICN Pharmaceuticals 社 (コスタ・メサ, カリフォルニア) 製) を含有させて実施した。コムギ胚を General Mills 社から入手した。コムギ胚抽出物を、上記のエリックソン及びブローベル (1983 年) (Erickson and Blobel(1983)) による記載と同様に示された改変を伴って調製した。3 グラムのコムギ胚を乳鉢中に置いて、かつ 10 ml のホモジナイズ用緩衝液 (100 mM の酢酸カリウム、1 mM の酢酸マグネシウム、2 mM の CaCl₂、40 mM のヘベス緩衝液 pH 7.5 (Sigma Chemicals 社 (セントルイス, ミズーリ) 製)、4 mM のジチオトレイトール) 中で粉碎して濃厚なペーストにした。このホモジネートを冷却された遠心分離管中に掻き取って、かつ 4 で 10 分にわたり 23000 × g で遠心分離した。得られた上清を、これらの条件で再度遠心分離して、S23 のコムギ胚抽出物を用意した。この S23 のコムギ胚抽出物を更に 50000 rpm で TLA100 型ロータ (Beckman Instruments 社 (パロ・アルト, カリフォルニア) 製) 中で 15 分にわたり 4 で超遠心 (100000 × g) した際に集合が改善されたので、この上清をインビトロ翻訳に使用した。この改善は、S23 のコムギ胚抽出物を使用する比較反応において得られた収量の 2 ~ 3 倍を提供した。この上清を、本出願中において“コムギ胚抽出物の高速上清”と言及するものとする。反応を、事前の記載 (リングアッパ, J.R. その他著、細胞生物学誌 (1984 年) 125 号: 99 ~ 111 頁 (Lingappa, J.R., et al., J. Cell. Biol. (1984) 125: 99-111)) と同様に実施し、但し以下に示す改変を行った。

【0072】

25 μ l のコムギ胚の転写 / 翻訳反応混合物は：5 μ l の Gag 転写物、5 μ l の 35 S エネルギー混合物 5 x 原液 (Sigma Chemical Co. 社 (セントルイス, ミズーリ) 製)、2.5 μ l の調節緩衝液 (Sigma Chemical Co. 社製)、1.0 μ l の 40 mM の酢酸マグネシウム (Sigma Chemical Co. 社製)、2.0 μ l の 125 μ M のミリストイル CoA (20 mM トリス酢酸 pH 7.6 中; Sigma Chemical Co. 社製)、3.75 μ l の 20 mM のトリス酢酸緩衝液 pH 7.6 (U.S. Biochemicals 社; (クリーブランド, オハイオ) 製)、0.25 μ l のクレアチンキナーゼ (4 mg/ml 原液、50% のグリセロール、10 mM のトリス酢酸中; (Boehringer Mannheim 社 (インディアナポリス, インディアナ) 製)、0.25 μ l の UshRNA (10 mg/ml 原液; Sigma Chemical Co. 社製)、及び 0.25 μ l の RNアーゼ阻害剤 (20 単位 / 50; Promega 社製) を含んでいた。

【0073】

翻訳開始の際にミリストイル補酵素 A (MCoA; Sigma 社 (セントルイス, ミズーリ) 製) を 10 μ M の濃度で添加し、これを示した。翻訳反応物は 20 ~ 100 μ l の容量の範囲に及び、かつ該反応物を 25 で 150 分にわたりインキュベートした。幾つかの反応物を、図面及び明細書に示す時間で以下の試薬の最終濃度に調整した：0.2 μ M のエメチン (Sigma 社製); 翻訳物 1 mL につき 1.0 単位の アピラーゼ (Sigma 社製); 0.002%、0.1%、又は 1.0% の “NIKKOL”。パルスチエイス実験においては、翻訳反応物は放射能標識のための 35 S システイン (Amersham Life Sciences 社 (クリーブランド オハイオ) 製) を含有した。4 分間の翻訳反応時間の後に 3 mM の未標識システインを添加して、かつこの反応を 25 で、追跡時間を変動させて続行し、以下に記載された実験においてこれを示した。タンパク質合成を、無細胞翻訳 / 組立系において Gag Pr 55 タンパク質をコードする mRNA を添加することにより開始した。選択的に、系が転写手段、例えば SP6 又は T7 ポリメラーゼを含有する場合には、この反応をこのタンパク質をコードする DNA を添加することにより開始してよい。完全なタンパク質合成及びキャプシドの組立は、通常、約 150 分以内で達成される。

【0074】

3. 沈降係数の評価

13 ml のスクロース勾配上に見られる Gag 含有複合体の S 値の評価を、マクユーン, C. R. 著、生化学分析 20 号 114 ~ 149 頁 (1967 年) (McEwen, C. R., Anal. Biochem. 20:114-149(1967)) の方法により、以下の式：

$$S = I / \int_0^t \frac{dI}{dt} dt$$

[式中、S はズヴェドベリ単位の粒子の沈降係数であり、I は分離領域でのスクロースに関する時間積分からメニスカスでのスクロースに関する時間積分を引いたものであり、 $\frac{dI}{dt}$ はラジアン / 秒のロータ速度であり、かつ t は秒の時間である]

を使用して決定した。I の値を、1.3 g / cm³ の密度の粒子及び 5 の温度について、マクユーン, C. R. 著、生化学分析 20 号 114 ~ 149 頁 (1967 年) (McEwen, C. R., Anal. Biochem. 20:114-149(1967)) により公開されている表により決定した。勾配中の種々の分画について推定された S 値を、本出願中に示される各勾配の記録の上部にマーカーとして表示する。マーカー、例えば BSA (5 S)、マクログロブリン (20 S)、B 型肝炎ウイルスキャプシド (100 S)、リボソームサブユニット (40 S 及び 60 S)、及びポリソーム (> 100 S) を使用して、これらと勾配とを対応させて、かつ推定された S 値を確認した。しかしながら、この各 Gag 含有複合体の S 値の研究は近似評価であるので、約 \pm 10% ほど変動しうることに留意すべきである。

【0075】

実施例 2

無細胞系における Gag Pr 55 タンパク質の翻訳

10

20

30

40

50

本実験の目的は、実施例1に記載された無細胞系で形成されたキャプシドが、細胞内で形成されたキャプシドと実質的に同様であることを示すことであつた。Cos-1細胞(カリフォルニア大学細胞培養施設(University of California Cell Culture Facility))を、アデノウイルス系の方法(フォーセイエス, J. R. 及びガルシア, P. D. 著、生物技術17号: 354~358頁(1994年)(Forsayeth, J.R. and Garcia, P.D., Biotechniques 17:354-358(1994))により、プラスミドpSVGagRRE-R(Gag及び哺乳動物細胞内でGagの発現に必要なRev応答要素をコードする哺乳動物発現ベクター)及びpSVRev(Rev遺伝子、即ち哺乳動物細胞内でGagの発現に必要な産物をコードする哺乳動物発現ベクター)(スミス, A. J. その他著、ウイルス学誌67号: 2266~2275頁(1993年)(Smith, A.J., et al., J.Virol. 67:2266-2275(1993))を使用してトランスフェクションした。これらのベクターは、D. レコッシュ(D. Rekosh)(バージニア大学)により提供されたものであつた。また、細胞をpBRUenvを用いてトランスフェクションした。トランスフェクションの4日後に、未熟HIV粒子を4mlの20%のスクロースのクッションを介して、SW40型ロータ中で29000rpmで120分にわたり沈降させることにより培養液から精製した(マージナー, K. その他著、ウイルス学186号: 25~39頁(1992年)(Mergener, K., et al., Virology 186: 25-39(1992)))。沈殿物を回収して、アリコートで-80において貯蔵して、かつ使用する直前に1%のNP40緩衝液で処理してエンベローブを除去した。エンベローブを伴わないこれらの基準未熟HIVキャプシドを標準物として使用して、かつ無細胞反応の産物と一緒に並行して種々の方法、例えば速度沈降、平衡遠心、及び電子顕微鏡により分析した。

10

20

【0076】

等密度CsCl勾配を介するキャプシドの移動の比較を図2に示し、無細胞翻訳/組立系において形成されたキャプシドを図2Aに示し、かつトランスフェクションされたCos細胞内で形成されたキャプシドを図2Bに示す。10 μ MのMCoA及び³⁵Sメチオニンを含有する無細胞翻訳及び組立反応物を、HIVGag転写物を用いて設定して、かつ実施例1に詳説された条件下でインキュベートした。反応の終盤では、試料を1%NP40(非イオン界面活性剤)を含有する緩衝液中に希釈して、かつ適したスクロースの段階的又は直線的な勾配を利用する公知技術の標準的方法により、スクロース段階的勾配上

で可溶物分画と粒子物分画とに分離した。粒子物分画を回収して、13mlの15~60%の直線的なスクロース勾配上での速度沈降(Beckman製SW40型Tiロータ、35000rpm、75~90分)により分析した。これらの勾配からの分画を回収して、かつ標準的方法によりラウリル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)分析した。分画中に存在するGagポリペプチドを、Gagに対するモノクローナル抗体(Dako社(カーペンテリア, カリフォルニア)製)を用いてイムノブロットイングにより可視化した。結合された抗体を、増強化学発光システム(Amersham社製)を使用して検出した。バンド密度を以下の画像解析の下で測定してこれを示し、かつ相対的なバンド密度を種々の露光時間を示すフィルムの定量により確認した。

30

40

【0077】

並行の粒子物分画の分析を、該粒子物分画を標準的方法によりCsCl勾配分離(2ml等密度CsCl、402.6mg/ml; Beckman製TLA100型遠心分離機内で50000rpm)することにより実施した。分画を回収して、かつGag翻訳産物(Pr55)について評価した(図2B、白抜き丸、勾配の最上層は分画1)。放射能標識Pr55を含有する分画を、更にSDS-PAGE分析した; 種々の分画のGag含有量を、ゲルから作製されたオートラジオグラフのデンシトメトリーを監視することにより評価した。両方の条件により、同一の放射能標識タンパク質のバンドがこれらの条件下で現れた。粒子物分画中の物質(>500S)を、更に以下に記載される種々の方法により分析した。無細胞系で生成され界面活性剤処理されたキャプシド及び界面活性剤処理された(エンベローブを伴わない)基準キャプシドは、約750Sという粒子の比較的均一

50

な集団として挙動し(図2Aと2Bとを比較のこと)、その際、 $1.36 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ の浮遊密度を有していた。追加的に、無細胞組立キャプシドと基準の標準物とは大きさが同一であり、このことはゲル濾過により判断した。電子顕微鏡分析により、無細胞系で作製されたキャプシドは、トランスフェクションされた細胞から放出された基準キャプシドと形態的に類似しており、かつこれらは予想される約100nmの直径(ゲルダブロム, H. R. 著、AIDS 5号: 617~638頁(1991年))(Gelderblom, H.R., AIDS 5: 617-638(1991))を有していることが明らかになった。このように、無細胞系で合成された放射能標識Pr55タンパク質は、トランスフェクションされた細胞内で生成された基準未熟HIVキャプシドと厳密に類似している粒子を組立て、このことはEM像並びに大きさ、沈降係数、及び浮遊密度の生化学的基準により判断される。

10

【0078】

Pr55をコードするHIV Gag 転写物の無細胞系での翻訳により、翻訳反応物1マイクロリットルにつき約2ngのPr55が合成された。例えば上記の特定の因子及び成分の増大を伴う連続フロー翻訳系(スピリン, A. S. その他著、サイエンス誌(1998年)242号: 1162~1164頁(Spirin A.S. et al., Science 242:1162-1164)(1998))を利用することにより、産生の増加が達成することができたと考えられる。

【0079】

実施例3キャプシド組立中間体の免疫沈降

未変性条件下での免疫沈降を、2 μL の無細胞反応物試料を30 μL の1%NP40緩衝液中に希釈して、かつ約1.0 μg のモノクローナル抗体23cの1種(がん研究所(Institute for Cancer Research)(ロンドン、英国); Stressgen社(バンクーバー, プリティッシュコロンビア)製)を添加することにより実施した。抗体を含有する試料を、1時間にわたり氷上でインキュベートして、50%のプロテインGビーズのスラリー(Pierce社(ロックフォード, イリノイ)製)又はプロテインAアフィゲル(BioRad社(リッチモンド, カリフォルニア)製)を添加して、かつインキュベーションを1時間にわたり4 で、常に混合しながら実施した。このビーズを、0.1MのトリスpH8.0を含有するNP40緩衝液中で2回洗浄して、かつ次いで洗浄緩衝液(0.1MのNaCl、0.1MのトリスpH8.0、4mMの酢酸マグネシウム)中で2回洗浄した。タンパク質を、20 μL のSDS試料緩衝液中で沸騰させることによりビーズから溶出させて、かつ十分に公知の技術の方法によりSDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより可視化した。

20

30

【0080】

実施例4HIVキャプシド中間体の同定

本実験の目的は、無細胞系を使用して、他の方法では検出が困難又は不可能なHIV組立中間体を検出することであった。連続的に標識された無細胞反応物を速度沈降により分析した。Pr55の無細胞翻訳及び組立を、上記の実施例1の記載と同様に実施した。無細胞反応完了後に、この産物を氷上で1%のNP40試料緩衝液中に希釈して、かつ13mlの15~60%のスクロース勾配上での速度沈降により分析した。分画を各勾配の最上層から回収して、かつ各分画中の放射能標識Pr55タンパク質の量を定量して、かつ反応物中に存在する全Pr55タンパク質のパーセントとして表現した。10S、80S、150S、500S及び750Sの複合体の推定位置を、図面上部にマーカーで示す(図3Aを参照のこと)。750Sは、基準未熟(エンベロープを伴わない)HIVキャプシドの位置に相当する。10S、80S、150S又は500Sの推定沈降係数を有する中間複合体を、本出願中においてはそれぞれ中間体A、B、C又はDと言及するものとする。

40

【0081】

更なる実験は、同定された中間体が組立中間体に相当することを示すものであり、このことは同定された中間体が反応の間の前期の時点では大量に存在し、かつ後期では減少し

50

たという観察により立証された。パルスチェイス分析を使用して、小規模の放射能標識 P r 5 5 鎖群を組立反応の間にわたり経時的に追った。P r 5 5 の無細胞翻訳及び組立を実施例 1 において説明された方法により実施し、但し ^{35}S システインを放射能標識に使用した。4 分間の翻訳反応の段階で、更に放射能標識されないように過剰の未標識システインを反応物中に添加した。この反応物のアリコートを、25 分 (図 3 C) 及び 150 分 (図 3 D) の反応段階で回収した。1 マイクロリットルの各アリコートに SDS - PAGE 及び AR により分析して、各追跡時間で存在する放射能標識 P r 5 5 翻訳産物 (図 3 B において矢印で示す) の全量を明らかにした。アリコートの残部を、氷上で 1 % の NP 40 試料緩衝液中に希釈して、かつ上記の図 3 A についての記載と同様に 13 ml の 15 ~ 60 % のスクロース勾配上での速度沈降により分析した (図 3 C 及び 3 D それぞれ)。放射能標識 P r 5 5 の全量は、パルスチェイス反応の 25 分の段階と 150 分の段階とは同様であり、このことは更なる P r 5 5 鎖の放射能標識も分解も 25 分後には生じないことを示しており、かつ P r 5 5 鎖の同様の集団が両方の時点で分析されていたことを確認するものである。

10

【0082】

25 分の反応時間の後に、全ての放射能標識 P r 5 5 が、複合体 A、B 又は C 中に見出され (図 3 C)、その際、放射能標識 P r 5 5 鎖は完全 750 S キャプシド領域中には存在しなかった。複合体 A 及び B が勾配の約 10 S 及び約 80 S の位置でピークとして現れた一方で、複合体 C は約 150 S の位置でほとんど目立たない肩部として現れた。これとは著しく対称的に、150 分の組立反応についての試験は、相当量の放射能標識 P r 5 5 が 750 S の位置に移動する完全キャプシドを組み立てることを示した (図 3 D)。これに対応して、複合体 A、B、及び C 中の P r 5 5 の量が、組立てられたことが目下判明した量ほど正確に減少し、このことは複合体 A、B、及び C 中の少なくとも幾つかの物質が、完全 750 S キャプシドの生物的発生において中間体を構成することを示すものであった。

20

【0083】

幾つかの放射能標識鎖が完全に合成されたにすぎない極めて短い追跡時間 (即ち、13 分) では、全長 P r 5 5 鎖が専ら 13 ml のスクロース勾配上の複合体 A 中に見出された一方で、依然として完全にされていない発生期の鎖は 100 S を上回るポリソームの形態中に存在した。このように、ポリソームと会合する発生期の G a g 鎖は、この経路内の出発物質を構成して、かつ完全 G a g 鎖を含有する 10 S の複合体 A は未熟キャプシドの形成においておそらく最初の中間体であった。従って、複合体 B 及び C は、キャプシド形成経路における後期の組立中間体に相当する。

30

【0084】

複合体 A、B、及び C が HIV キャプシドの組立において中間体を構成したことの更なる確証として組立の遮断について研究し、G a g 鎖が A、B 及び C の S 値に相当する S 値を有する複合体の形態で蓄積するかどうかということ、及び経路の途中の種々の点での遮断により、複合体 A、B、及び C が種々の組合せで蓄積するかどうかということ、組立過程の間のこれらの出現順により判断した。例えば、順序的な中間体経路が存在すれば、その場合は経路の初期での遮断により、推定される初期の組立中間体に相当する 1 種又は 2 種の G a g 含有複合体が蓄積するはずである一方で、経路の極端な後期での遮断により、推定される全種の組立中間体が蓄積するが最終的な完全キャプシド産物は蓄積しないはずである。

40

【0085】

キャプシドの組立を、アピラーゼを翻訳後に添加すること又は界面活性剤を翻訳と同時に添加することの何れかで破壊して、かつこの反応産物を速度沈降により分析した。組立中間体及び完全キャプシドに相当する分画中の物質を定量して、以下の第 1 表中に示す。

【0086】

第 1 表

【0087】

50

【表 1】

H I Vキャプシド組立に対する薬理的遮断の効果

	A	B/C	最終キャプシド
未処理	2798	5046	739
+ アピラーゼ	2851	5999	133
+ 界面活性剤	2656	6130	189

10

【0088】

未処理反応物は複合体 A、B、及び C 中に Pr 55 を含有し、かつ最終的な 750 S キャプシドの位置でピークを有する一方で、処理反応物は最終的なキャプシド産物の位置でピークを有さない（第 1 表）。アピラーゼ又は界面活性剤の何れかを用いて処理することにより、複合体 B、C 中では追加的な物質が蓄積したが、複合体 A 中では追加的な物質は蓄積しなかった。このことは、複合体 B 及び C が 750 S の完全キャプシドにより近い前駆体であり、かつこれらの介入は複合体 B 及び C の完全に組立てられたキャプシド最終産物への変換を遮断するとの見解と合致するものである。

【0089】

20

実施例 5

H I Vキャプシド中間体形成に関する宿主細胞タンパク質

分子シャペロンは、おそらくポリペプチドの組立を促進する候補であるので、種々の分子シャペロンのエピトープに対する抗体を、無細胞系で合成された放射能標識 Gag 鎖免疫共沈降能に基づいてスクリーニングした。23c モノクローナル抗体 (23c) はそれぞれ、未変性条件下で放射能標識 Gag 鎖を免疫共沈降させたが (図 4 A)、未変性のタンパク質-タンパク質の相互作用を破壊する変性後では該 Gag 鎖を免疫共沈降させなかった (図 4 B)。この抗体は、幾つかの真核細胞タンパク質、例えば分子シャペロン T C P - 1 中に存在する 3 個のアミノ酸のエピトープ (L D D c o o H)^{1 2, 1 3} を認識した。23c は、無細胞系において翻訳された他の基質、例えば - チューブリン、 - グロビン、B 型肝炎ウイルスキャプシドタンパク質 (コア)、及び N C ドメインと p 6 ドメインとを欠き組立能を有さない Gag 突然変異体 (p 4 1) を、未変性条件下 (図 4 A) 又は変性後 (データ示さず) において免疫共沈降させることができなかった。H I V - 1 Gag 鎖の 23c による免疫共沈降は、23c をプレインキュベートする際に用いたコムギ胚 (W G) 抽出物の量に依存して阻害された (図 4 C)。これらのデータは、無細胞組立反応のために細胞質ゾル因子の源として使用される W G 抽出物が、組立てられている H I V - 1 Gag 鎖と選択的に会合する 23c により認識されるタンパク質を含有することを示している。

30

【0090】

23c は、単一の 68 k D の W G タンパク質を、イムノプロットティング (図 4 D) 及び未変性条件下での免疫沈降の両方により認識した (図 4 D、レーン 1 と 3 とを比較のこと)。W G 抽出物の速度沈降により、この 68 k D の W G タンパク質 (W G H 68 又は H P 68) が 5 S の分画に移動することが明らかになった (データ示さず)。この分子量及び沈降特性は、H P 68 が、十分に特性決定され 23c により認識されるタンパク質、例えば分子シャペロン T C P - 1 (20 S 粒子を形成する 55 k D タンパク質) にも p 105、即ちゴルジコートマー複合体の 105 k D の成分^{1 4} にも相当しないことを示すものであった。ウエスタンプロットティング又は免疫沈降による P 68 の認識は、L D D c o o H 含有ペプチドを 125 μ M で添加することにより阻害されたが、対照ペプチドの添加によっては阻害されず (データ示さず)、このことは、予想通り 23c が H P 68 をこのエピトープにより認識することを示している。キャプシドの組立の間にいつ H P 68 と Gag

40

50

とが会合するのかを判断するために、小規模の G a g 鎖群を、反応物を³⁵S-システインでパルスすることにより放射能標識して、そして未標識システインを用いて追跡した。免疫共沈降を、パルスチェイス組立反応の間に種々の時間で実施した。反応物中の放射能標識 G a g の全量が、最初の 20 分後には一定を保った一方で (データ示さず)、23c により免疫共沈降された G a g の量は反応過程にわたり増加して、120 分でピークに達した (図 5 A)。これらのデータは、S G H P 6 8 と G a g とが、G a g 合成 (大部分が 45 分の無細胞反応の段階により完了する⁷) の間に会合したのではなく、G a g 鎖が翻訳後、即ち多量体の複合体が形成されている際に会合して、完全にされた未熟 H I V - 1 キャプシドが組立てられたことを示唆している。組立反応の第 3 の時間にわたる 23c の免疫反応性の急激な降下 (図 5 A) は、H P 6 8 が G a g と一時的に会合したにすぎず、一度組立が完了すれば G a g 鎖を解放したことを示唆している。

10

【0091】

H P 6 8 が特異的な組立中間体と会合するかどうかを判断するために、G a g 転写物を用いて設定された無細胞反応物を速度沈降により分析して、かつこの分画を 23c を用いて免疫共沈降させた。これらの分画中の全産物の分析により、放射能標識 G a g 鎖は 750 S の完全にされた未熟キャプシドの位置 (図 5 B、黒塗りのバー)、並びに上記の 10 S、80 S、及び 500 S の組立中間体の位置に存在することが明らかになった。これに対して、G a g 鎖は 23c により 10 ~ 80 S 及び 500 S の分画からのみ免疫共沈降された (図 5 C)。分解物が多い 10 ~ 80 S の範囲の勾配は、10 S の中間体ではなく、80 S の中間体がこの範囲で 23c の免疫反応性の大半を占めたことを示している (データ示さず)。無細胞における B 型肝炎ウイルスキャプシド組立反応物を、対照として並行して分析した (データ示さず)。組立中間体及び完全に組立てられたキャプシドを両方とも無細胞系において形成する H B V コア鎖¹⁵は、23c によっては免疫共沈降されなかった。このように、G a g 含有複合体の分析は時間経過の結果 (図 5 A) に合致しており、H P 6 8 は新たに合成され部分的に組立てられた H I V - 1 G a g 鎖と選択的に会合するが、完全に組立てられた 750 S キャプシドとも、無関連なウイルスの組立中間体とも会合しないことを示している。

20

【0092】

実施例 6

H I V 用の宿主タンパク質の精製、シーケンシング、及び同定

30

イムノアフィニティ精製のために、1ml の W G 抽出物を 100000 rpm で B e c k m a n 製 T L 100 . 2 型ロータ内で 15 分にわたり遠心分離した。この上清を、50 μ g のアフィニティ精製 23c 抗体 (S t r e s s g e n 社製) 又は等量の対照抗体 (- H S P 70、A f f i n i t y R e a g e n t s 社製) を使用して免疫沈降させた。免疫沈降溶出物を S D S - P A G E により分離して、かつポリビニリデンジフルオリド膜に転写した。単一の 68 k D のバンドはクーマシー染色により 23c 免疫沈降のレーン中に観察されたが、これ以外はその列上で観察されなかった。このバンドの一部をマイクロシーケンシング (P r o S e q 社、セーレム、マサチューセッツ) のために切り出して、かつ残部をイムノプロットングに使用してバンドが 23c 抗体により認識されることを確認した。N 末端が閉鎖された精製タンパク質を、C N B r を用いて開裂して、かつ o - フタルアルデヒドを用いて処理して、プロリンを N 末端近傍に含有するペプチドのエドマン分解法を使用する選択的なマイクロシーケンシングを可能にした。

40

【0093】

W G H P 6 8 の C 末端ペプチド配列に相応する以下の縮重 3' オリゴヌクレオチドを合成した :

A T G A A T T C (A C T G) G G (A C T G) C G (G A) T A (G A) T T (A C T G) G T (A C T G) G G (G A) T C (配列番号 3) 及び
A T G A A T T C (A C T G) G G (C T) C T (G A) T A (G A) T T (A C T G) G T (A C T G) G G (G A) T C (配列番号 4)

【0094】

50

WGHP68コーディング領域を、テンプレートとしてのWGcDNA (Invitrogen社製)、WGHP68のC末端ペプチド配列に相応する3'オリゴ物及びcDNAがクロニングされるベクターに相応する5'オリゴ物を使用してPCRにより増幅した。このPCR反応を、独立して4回実施して、かつ各回において単一の2kB産物がもたらされた。これらのPCR産物をTACクロニング (Invitrogen社製) によりベクター中にライゲーションした。DNAシーケンシングにより、各cDNA産物が同一であることが明らかになった。3'及び5'コーディング末端及び非コーディング末端を、HP28の内部領域の配列に相応する縮重オリゴ物を使用してネステッドRACE PCR反応を介して得た。cDNAクローンを重複させることにより、WGHP68の完全なオープンリーディングフレームを定めた。開始点を、開始メチオニンにおいて定義されたコザックコンセンサス配列が存在すること、最初のメチオニンの上流に2つのインフレームの停止コドンが存在すること、推定開始部位から上流にATGコドンが存在しないこと (コザック著、哺乳動物のゲノム (1996年) 7号: 563~574頁 (Kozak, Mamm Genome(1996) 7: 563-74))、及びGenBankのヒトホモログ (ビスバールその他著、生化学誌 (1995年) 270号: 13308~13317頁 (Bisbal et al. J Biol Chem, (1995)270: 13308-17)) とのホモロジーにより同定した。WGHP68のコーディング配列 (配列番号5) を、GenBankにAY059462の登録番号下で寄託した。

10

【0095】

Hu及びWGHP68のC末端ペプチド (図6)、並びにヒトRNアーゼLのN末端の19個のアミノ酸に対するウサギポリクローナル抗血清を、ウサギにKLHに結合されたペプチドを注射することにより生成させた。アフィニティ精製 HuHP68b抗血清を、抗血清をアガロースに結合されたHuHP68のC末端ペプチドに結合させて、かつグリシンを用いて溶出させることにより調製した。

20

【0096】

Cos-1細胞を、サイモンその他著、ウイルス学誌 (1997年) 71号: 1013~1018頁 (Simon et al, J. Virology, (1997) 71: 1013-18) に記載されているGag発現プラスミドpCMVRev及びPSVGagRRE-Rを使用してトランスフェクションした。哺乳動物発現用のHP68プラスミドを、PCRを使用して構築して、WGHP68の1~378番目のアミノ酸のコーディング領域を、pCDNA3.1 (Invitrogen社製) のNhe1/Xba1で挿入した。全ての構築物のコーディング領域をシーケンシングした。細胞を、Gibco社製のリポフェクタミン (Cos-1) 又はリポフェクタミンプラス (293T) を使用してトランスフェクションした。全てのトランスフェクションには一定量のDNA (60mmディッシュにつき18µg) を使用した。トランスフェクションの24時間後に培地を替えて、かつ回収をトランスフェクションの28時間後又は60時間後に、免疫蛍光及びイムノプロットングのそれぞれのために実施した。免疫蛍光のために、細胞をパラホルムアルデヒドで固定して、1%のトリトンを用いて浸透化して、かつマウスHIV-1Gag抗体 (1:50) 及びアフィニティ精製HuHP68抗血清 (1:2000) と共にインキュベートして、続いてCy3及びCy2結合二次物 (Jackson社製) (1:200) と共にインキュベートした。178個の細胞が定量された。図7のイムノプロットングのために、ラットIgGをトレーサーとして10µg/mlで回収時に培地に添加して、かつ細胞をSDS試料緩衝液中に回収して沸騰させた。イムノプロットの定量のために、バンドと、既知の試料の量を用いて作成されたイムノプロット標準曲線とを比較した。

30

40

【0097】

イムノプロットング (図8及び9) を後続に行う免疫沈降のために、上記のアフィニティ精製 HuHP68抗血清を、プロテインGビーズ (7mg/mlビーズ) に結合させて、HuHP68bを生成させた。60mmディッシュ中の集密的なCos-1細胞をトランスフェクションして、300µlのNP40緩衝液中に回収して、かつ100µlの溶解物を50µlのHuHP68bを用いて免疫沈降させた。この免疫沈降物を、

50

S D S - P A G E に続き上記抗体を用いてイムノブロットィングすることにより分析した。

【 0 0 9 8 】

W G 抽出物 (1 5 0 μ g) を、 4 5 分にわたり 4 で、 W G H P 6 8 に対する抗体が結合された 1 0 0 μ l のビーズを用いて免疫除去した。無細胞反応物 (1 5 μ l) を設定して (リンガッパその他著細胞生物学誌 1 3 6 号 : 5 6 7 ~ 5 8 1 頁 (1 9 9 7 年) (Lingappa et al J. Cell Biol 136:567-81(1997)))、その際、非除去 W G 又は除去 W G を使用した。除去 W G を含有する幾つかの反応物に、精製 W G H P 6 8 - G S T 又は H u H P 6 8 - G S T 融合タンパク質又は G S T を単独で反応開始時に添加した (約 2 0 n g / μ l の 2 μ l)。 2 6 で 3 時間の後に、 N P 4 0 を 1 % の最終濃度になるまで添加して、かつ反応物を速度沈降させた (5 m l、 1 5 ~ 6 0 % のスクロース勾配、 B e c k m a n 製 M L S 5 5 型ロータ : 4 5 0 0 0 r p m、 4 5 分)。フラクショネーターを使用して回収された 3 0 の分画を、 S D S - P A G E 及び A R に続く各レーンの G a g についてのデンシトメトリーにより分析した。プロテイナーゼ K 消化のために、勾配の 5 0 0 S 及び 7 5 0 S の領域からの分画のアリコートを回収して、かつ 1 0 分にわたり室温で、プロテイナーゼ K を用いることなく又は 0 . 1 μ g / m l のプロテイナーゼ K を用いてインキュベートした。消化を、 S D S を添加して、かつ凍結させることにより終了させた。試料を S D S - P A G E 及び A R により分析した。グラフは、 3 回の独立した実験の平均 (\pm S E M) を示すものである。

10

【 0 0 9 9 】

精製 H P 6 8 を生成させるために、 W G H P 6 8 及び H u H P 6 8 を、 p G E X ベクター (P h a r m a c i a 社製) 中にサブクローニングして、 G S T を N 末端で含有する融合タンパク質をコードさせた。発現を、 1 m M の I P T G を用いて 3 時間にわたり誘導した ; サルコシル (0 . 5 %) 及び P M S F (0 . 7 5 m M) を、超音波処理後に添加した。 1 7 0 0 0 \times g 上清を、グルタチオンビーズと共にインキュベートして、かつ 4 0 m M のグルタチオンを用いて p H 8 . 0 の 5 0 m M トリス中に溶出させた。溶出物中の融合タンパク質及び G S T の濃度を、クーマシープラスプロテインアッセイ (P i e r c e 社製) を使用して定量した。

20

【 0 1 0 0 】

2 つの無細胞反応物を H I V - 1 G a g 転写物及び免疫除去 W G を用いて設定して、かつ W G H P 6 8 - G S T をこれらの反応物の一方に添加した。並行して、 C o s - 1 細胞をトランスフェクションすることにより G a g を発現させ、かつ未熟 H I V - 1 粒子を放出させた。無細胞反応物及びトランスフェクションされた細胞からの培地を 1 % の N P 4 0 で処理してキャプシドと会合しているエンベロープ及び膜を除去して、 2 m l の 2 0 ~ 6 6 % のスクロース勾配上で速度沈降させた (B e c k m a n 製 T L S 5 5 型ロータ、 3 5 分、 4 5 0 0 0 r p m)。

30

【 0 1 0 1 】

コムギ胚 H P 6 8 (W G H P 6 8) を、 2 3 c 抗体を使用してイムノアフィニティ精製により W G 抽出物から単離した。マイクロシーケンシングにより、 2 箇所明確に定義された 2 4 以上のアミノ酸の配列がもたらされた。この各配列は、ヒト R N アーゼ L 阻害剤として同定された単一の 6 8 k D タンパク質 (ビスバールその他著、 J B C (1 9 9 5 年) 2 7 0 号 : 1 3 3 0 8 ~ 1 3 3 1 7 頁 (Bisbal et al. JBC(1995)270: 13308-17) ; G e n B a n k A 5 7 0 1 7、配列番号 6) の別々の領域に対して約 7 0 % のホモロジーを有した (図 6)。 C 末端ペプチドに相応する縮重オリゴヌクレオチド (配列番号 3 及び 4) を使用して、 2 k B の c D N A を W G c D N A 混合物から増幅した。シーケンシングにより、この c D N A は 6 8 k D ヒト R N アーゼ L 阻害剤 (本出願中では H u H P 6 8 と称する) (ビスバールその他著、 J B C (1 9 9 5 年) 2 7 0 号 : 1 3 3 0 8 ~ 1 3 3 1 7 頁 (Bisbal et al. JBC(1995)270: 13308-17) ; ビスバールその他著、分子生物学研究法 (2 0 0 1 年) 1 6 0 号 : 1 8 3 ~ 1 9 8 頁 (Bisbal et al. Methods Mol Biol (2001) 160:183-98)) をコードする c D N A に対して全体で 7 0 % の同一性を有している

40

50

ことが明らかになった。WGHP68のオープンリーディングフレームを推測して、かつその完全なアミノ酸を予測した(図6)。WGHP68のこの604個のアミノ酸の配列は、ヒトRNアーゼL阻害剤(HuHP68)の599個のアミノ酸の配列と全体で71%の同一性を示している。WGHP68及びHuHP68は、両方とも2種の古典的なATP/GTP結合モチーフ(トロウト T. 著、欧州生化学誌(1994年)222号:9~19頁(Traut T. Eur J. Biochem (1994) 222: 9-19))及びLDD-c o o Hエピトープを含有する(図6)。

【0102】

HuHP68は、RNアーゼL、即ちポリソームと会合し(サレーツアダその他著、JBC(1991年)266号:5808~5813頁(Salehzada. et al JBC (1991) 266:5808-13); チョウその他著、セル誌(1993年)72号:753~765頁(Zhou et al. Cell (1993) 72: 753-65))、かつインターフェロン感受性の2'-5'オリゴアデニル酸(2-5S)経路により活性化されるインターフェロン依存性ヌクレアーゼと結合して阻害することが知られている(ビスバルその他著、JBC(1995年)270号:13308~13317頁(Bisbal et al. JBC (1995) 270: 13308-17); ビスバルその他著、分子生物学研究法(2001年)160号:183~198頁(Bisbal et al. Methods Mol Biol (2001) 160:183-98))。RNアーゼLのインターフェロン依存性誘導及び活性化により、多くのウイルスRNAが分解される(プレイヤーその他著、治療薬理学(1998年)78号:55~113頁(Player et al. Pharmacol Ther. (1998) 78: 55-113); サミュエル C. 著、ウイルス学(1991年)183号:1~11頁(Samuel C. Virology(1991) 183: 1-11); センその他著、JBC(1992年)267号:5017~5020頁(Sen et al. JBC (1992) 267: 5017-20))。68kDのRNアーゼL阻害剤(HuHP68)をHIV-1感染細胞内で過剰発現させると、RNアーゼL活性が減少されることによりビリオン産生が増加されて、高レベルのHIV-1 RNA及びHIV-1の特定のタンパク質がもたらされることが今までに示されている(マルティナンドその他著、ウイルス学誌(1999年)73号:290~296頁(Martin and et al. J. Virology (1999) 73: 290-6))。無細胞HIV-1キャプシド組立の間にWGHP68が翻訳後のGag含有中間体に結合するというこれらの所見は、HuHP68が事前の記載(サレーツアダその他著、JBC(1991年)266号:5808~5813頁(Salehzada. et al. JBC (1991) 266:5808-13); チョウその他著、セル誌(1993年)72号:753~765頁(Zhou et al. Cell (1993) 72: 753-65))と同様にRNアーゼLに結合し阻害する他に、完全に合成されたGag鎖にその翻訳後に細胞内で結合し、かつ作用するかどうかという更なる調査を導くものである。

【0103】

実施例7

感染ヒト細胞におけるHP68とHIV-1Gagとの会合

HP68の機能を細胞内において分析するために、WGHP68の内部及びC末端残基の両方並びにHuHP68のC末端残基に対するペプチド特異的ポリクローナル抗体を生成した。これらの抗血清は、WG及び霊長類細胞中の68kDタンパク質を免疫沈降及びウエスタンブロッティングによりそれぞれ特異的に認識した。68kDバンドの検出を、このペプチドをこれに対する各抗体と共にプレインキュベートすることにより回避した。HuHP68に対するアフィニティ精製抗血清を生成して、かつプロテインAビーズに結合させて(HuHP68b)、かつ該抗血清がヒト及びサルのHP68の両方について親和性が高いことを見出した。HP68が、組立てられているHIV-1Gag鎖とヒト細胞内で会合するかどうかを判断するために、ヒト293T細胞を、HIV-1の全ゲノムをコードし、但しenv遺伝子部分を欠失するプラスミド(pBRUenv)²⁵を用いてトランスフェクションした。細胞を非イオン界面活性剤で回収して、かつ未変性条件下及び変性後にaHuHP68bを使用して免疫沈降させた。この免疫沈降物を、HIV-1Gagに対するモノクローナル抗体を使用してウエスタンブロッティングにより分析した。HIV-1Gagは、HuHP68により未変性条件下では免疫共沈降され

たが、変性後では免疫共沈降されなかった(図8A)。HP68はGagと、その翻訳後に会合すると考えられた。これらのデータにより、HuHP68は、成熟HIV-1ビリオンを産生しているヒト細胞内においてHIV-1Gagと会合することが明らかになった。

【0104】

更なる調査により、HP68とGagとは、並行して分析されたRNアーゼ処理及び未処理の細胞溶解物中においても会合することが明らかになった(図8A)。HuHP68と完全に合成されたGag鎖とが結合し、しかもインタクトなRNAの不存在下で結合するというこれらの所見は、この宿主タンパク質がGag含有複合体と、その翻訳後に結合されることを示すものであった。図8Bに示すように、GagとHP68とは、HuHP68bを用いて免疫沈降される際に未変性条件下では会合したが、変性後では会合しなかった。このことは、HP68が、HIV-1のプロテアーゼ及び他のHIV-1の特異的タンパク質の不存在下でHIV-1Gagに結合することを裏付けるものであった。図8Cに示すように、HP68は、野生型Gag及び組立能を有するp46突然変異体と会合したが、組立能を有さないp41突然変異体とは会合しなかった。このようにHP68は、無細胞系と同様に哺乳動物細胞内においても、組立てられているGag鎖と特異的に会合した。HP68とGagとがHIV-1感染細胞内において会合することを確認するために、完全に感染性を有するHIV-1を産生するヒトT細胞(ACH-2細胞)の溶解物について免疫共沈降を実施した。酢酸ミリスチン酸ホルボール(PMA)刺激され、慢性感染され、高レベルの感染性HIV-1を放出するACH-2細胞内においては、抗HuHP68は、Gag鎖を未変性条件下では免疫共沈降させたが、変性後では免疫共沈降させなかった。同様の結果が、低レベルの感染性ウイルスを産生する未刺激のACH-2細胞についても観察された(データ示さず)。

【0105】

HP68とGagとの同時会合の確証を、HIV-1発現ベクターpBRUenv(図10、列1~3)を用いてトランスフェクションされ、かつHIV-1Gagに対する抗体及びHP68に対する抗体を用いて二重標識されたCos-1細胞について免疫蛍光顕微鏡検査法を使用して示した。Gagは細胞の約40%で発現され、かつ大部分が集合したパターンで見出され(図10B、E、及びH)、該パターンはおそらくGagが原形質膜の粒子形成及び出芽の部位^{3 2}へ局在化することを示している。HP68染色により、2つの異なる局在化パターンが明らかになった。HP68は、トランスフェクションされることなく、かつHIV-1Gagを発現させない細胞の100%(図10A~C中の左側の2個の細胞)、及び対照タンパク質を発現させる構築物を用いてトランスフェクションされた対照細胞の100%に散在パターンで存在した。HIVGagを発現させる細胞内においてはHP68はまた粗く集合したパターンで見出された(図10D及びG)。図10C、F及びIは併合された画像を示すものであり、該画像においてはHP68とGagとが黄色の粗い集合物になって顕著に同時局在していた。HP68のGag含有集合物中への漸増は、HIV-1Gagを発現させている細胞の100%に見られた。これに対して、細胞をGagの組立不能な切断物(p41)をコードするpBRUp41envを用いてトランスフェクションした際には、HP68は集合したパターンでは見出されず、即ちHIVGagとは同時局在しなかった(図10G~I)。

【0106】

実施例8

HP68Gag複合体は選択的にHIV-1Vifと会合するが、RNアーゼLとは会合しない

本実験の目的は、ビリオン形成に關与する翻訳後のHP68-Gag含有複合体と、翻訳後のRNアーゼL含有複合体とが、たとえ両方ともHP68を含有していても異なるものであるかどうかを判断することであった。

【0107】

pBRUenvを発現させるCos-1細胞を、HuHP68bを使用して免疫沈

10

20

30

40

50

降させて、続いてV i fに対する抗体及びN e fに対する抗体を用いてイムノプロッティングして、これらの何れかのウイルスタンパク質がH P 6 8複合体中に存在するかどうかを判断した。更に細胞タンパク質であるR NアーゼLに対する抗体及びアクチンに対する抗体を用いてイムノプロッティングを実施した。HuHP68bは、これらの細胞からは未変性条件下でG a g及びV i fを免疫共沈降させたが、これら以外の細胞からは未変性条件下でH I V - 1 G a gを免疫沈降させたにすぎなかった(図11A)。更に、長時間にわたり作用を受けさせることにより、HuHP68bは、pBRU envを発現させる細胞内において組み立てられているビリオン中にG a gと共に存在する全長G a g P o lを免疫共沈降させることが明らかになった(データ示さず)。ビリオンの組立に関するH I V - 1 V i fはまた、未変性条件下で免疫共沈降されたが、変性条件下では免疫共沈降されなかった。これに対して、おそらく原形質膜との直接的な会合を介してビリオン中に取り込まれるウイルスタンパク質H I V - 1 N e fは、H P 6 8と会合することが見出されず、このことは選択されたH I V - 1タンパク質のみがH P 6 8と会合することを示している。H P 6 8を有するG a gとV i fとの会合物は、細胞を10mMのE D T Aで溶解した場合ですら存在した(図11B)。H P 6 8 - V i f相互作用の特異性の更なる証拠は、多量の細胞タンパク質アクチンとH P 6 8とが会合しないことを示すことにより得られた(図11A)。最後に、R NアーゼLはH P 6 8 - G a g - V i f含有複合体中には存在せず、このことはこの複合体と上記のR NアーゼL - H P 6 8複合体とが異なるという見解を支持するものである(図11A)。V i f会合の特異性を確認するために、HuHP68bを用いる免疫共沈降を、HuHP68bを生成するのに使用されたHuHP68のC末端ペプチド(図6)の存在下で実施した。200µMのHuHP68ペプチドの場合、該ペプチドはHuHP68に特異的に結合し、H P 6 8、G a g、及びV i fのHuHP68bによる免疫沈降を遮断する(図11B)。このように、H P 6 8 - G a g含有複合体は、第2のH I V - 1ウイルスタンパク質であるV i fと特異的に会合するが、該複合体はR NアーゼL又は多量の非特異的細胞タンパク質(アクチン)の何れをも含有せず、かつリボソームが破壊される際にも改変されない。これらの全ての所見は、H P 6 8が、R NアーゼL阻害剤としてのその翻訳後の機能とは別個の翻訳後の機能を有することを示している。

10

20

【0108】

実施例9

30

H P 6 8 - G a gは更にP o lに結合する

H P 6 8がウイルスの組立にわたり第2の機能を有することを更に示すために、翻訳後のH P 6 8 - G a g複合体はR NアーゼLを含有しないが、ビリオンの形態形成に関与することが知られている他の2種のウイルスタンパク質、即ちH I V - 1 G a g P o l及びH I V - 1 V i fを含有することを示す(図11)。H P 6 8が、完全に感染性を有するビリオンの組立に重要な3種のタンパク質(G a g、G a g P o l、及びV i f)と選択的に会合することは、キャプシド形成におけるH P 6 8の必須の役割を示す機能的なデータを強く支持している。特に、H I V - 1 V i fとH P 6 8との会合は、ビリオンの組立におけるH P 6 8の重要性を強調している。それというのも、H I V - 1物は感染の天然の標的である細胞に対して完全に感染性を有するビリオンの形成にインビボで必要とされるからである。更に、V i fはその産生細胞内においてビリオンの組立についての不確定の機構により作用して、かつその機能に必要な、依然として未同定の宿主因子との相互作用をおそらく必要とすることが知られている。V i fのH P 6 8への結合は、H I V - 1 G a gとは独立していると考えられる。それというのも該結合は、H I V G a gがN C)基部近傍を切断されH P 6 8に結合することができない突然変異体として発現された際にも生ずるからである。このように、H P 6 8は、ビリオンの組立に関与する少なくとも3種のタンパク質を有する複合体中で作用する。この複合体(又は複数の複合体)は、ビリオン形成において重要な翻訳後の役割を果たすものであり、かつウイルスmRNAを翻訳後に宿主により媒介される分解から保護する上記のR NアーゼL - H P 6 8複合体とは別個のものである。V i fは、G a gの場合と同様に1種を上回る異なる組立中間複合体中

40

50

でHP68に結合することが可能である。

【0109】

実施例10

ウイルス - 宿主の相互作用は、霊長類レンチウイルス間で保存されている

レトロウイルスの生活環におけるHP68の翻訳後の役割の重要性は、HIV-2及びSIVmac239のGagが両方ともHP68に結合するという観察により更に強調され、このことはこのウイルス - 宿主の会合の霊長類レンチウイルス間での保存を示している(図12を参照のこと)。

【0110】

実施例11

無細胞系におけるHCVキャプシドの組立

コムギ胚抽出物を使用して、実施例1に記載されたHIVキャプシドの組立系と同様にHCVコアポリペプチドの翻訳及び組立を設定するが、但しミリストイルCoAを系に添加する必要はない。未熟HCV-1キャプシドの効率的な組立を維持するために、この抽出物をしばらく超遠心した(極めて好適に阻害剤を除去するため; リンガッパその他著(1997年)細胞生物学136号: 567~581頁(Lingappa, et al., (1997) Cell Biol 136:567-81)を参照のこと)。HCVキャプシドの組立は、非イオン界面活性剤を組立反応物に添加することにより影響を受けるとは考えられない。このことは、HCVコアがおそらく細胞質内でキャプシドを組み立てて予め形成させるとの見解と合致するものである。一方、HCVコアがER膜の細胞質側の面と会合する疎水性尾部を有することが示されている(サントリニその他著(1994年)ウイルス学誌68号-3631~3641頁(Santolini, et al., (1994) J Virol 68-3631-41); ローその他著(1996年)ウイルス学誌70号: 5177~5182頁(Lo, et al., (1996) J Virol 70: 5177-82)。この会合は適切なHCVキャプシド組立に明らかに必要ではなく、かつ代わりにHCVコアとE1エンベロープタンパク質との会合において役割を果たすのであろう。

【0111】

2.5時間のインキュベーションの後に、HCVコア無細胞反応産物を1%のNP40を含有させて2mlのスクロース勾配上での速度沈降(Beckman製TLS55型ロータ中、5500rpm×60分)により分析した。分画(各200マイクロリットル)を勾配の最上層から回収して、かつSDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより試験した。~100Sの粒子がこの反応中において産生された(図13を参照のこと)。新たに合成されたHCVコア鎖の30~50%は、これらの~100S粒子を反応の終盤までに形成し、該粒子は中間層(M)に局在する。HCVコア鎖の残部は、最上層分画(T)及び沈殿層(P)中に存在し、このことは上記参照した無細胞系におけるHBVコアからのキャプシドの組立と厳密に類似している(リンガッパ, J. R. その他著(1994年)細胞生物学誌125号: 99~111頁(Lingapaa, J. R., et al., (1994) J Cell Biol 125: 99-111))。エンベロープを伴わない100S粒子がHCVキャプシドに相当することを確認するために、速度沈降勾配からのエンベロープを伴わない粒子を含有する分画(レーン6及び7)を、CsCl上での平衡遠心(TLS55型Beckman製ロータを使用、5000rpm×20時間)により分析し、その際、337mg/mlのCsCl溶液を使用した。分画を回収して、TCA沈殿させて、SDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより分析して、かつデンストメトリーにより定量した。HCVコアタンパク質は分画6でピークに達した。分画5/6(勾配の中間層、矢印で示す)の密度は、1.25g/mlである。約1.25g/ml(図14)という浮遊密度は、感染細胞内で産生された(エンベロープを有さない)HCVキャプシドの浮遊密度と同一である(カイト, M. その他著((1994年)一般ウイルス学誌75号: 1755~60(Kaito, M. et al., ((1994) J Gen Virol 75: 1755-60); ミヤモト, M. その他著(1992年)一般ウイルス学誌73号: 715~718(Miyamoto, H. et al., (1992) J Gen Virol 73: 715-8))。

【0112】

10

20

30

40

50

100S粒子を含有する分画を、透過型EMにより分析した〔(TEM)/図14に記載された速度沈降勾配からの分画6及び7をプールして、ホルムバル被覆されたグリッド上に置いて、酢酸ウラニルを用いてネガティブ染色して、かつTEMにより試験した〕。キャプソメアのサブユニットから組成される30~50nmの球状粒子が、明瞭に見られた。これは、エンベロープが除去された又は依然としてエンベロープを伴わないHCVキャプシドについて予想される大きさである(ミズノその他著(1995年)胃腸病学109号:1933~1940頁(Mizuno, et al., (1995) Gastroenterology 109: 1933-40); タカハシその他著(1992年)ウイルス学191号:431~434頁(Takahashi, et al., (1992) Virology 191: 431-4))。(これに対して、リボソームは12~20nmの直径を有することに留意のこと。)このように、本出願に示された3つの基準(速度沈降、浮遊密度、及び電子顕微鏡)により、HCVは感染細胞内に見出されるキャプシドと厳密に類似しているキャプシドを無細胞系においても形成するものである。

10

【0113】

実施例12同型の相互作用ドメインを含有するHCVコア切断物の組立

従来の見解は、HCVコアの相互作用ドメインが1~115番目のアミノ酸の親水性領域内に局在していることを示している(マツモトその他著(1996年)ウイルス学218号:43~51頁(Matsumoto, et al., (1996) Virology 218: 43-51); ノーランドト, O. その他著(1997年)一般ウイルス学誌78:1331~1340頁(Nolandt, O. et al., (1997) J Gen Virol 78: 1331-40); ヤン, B. B. その他著(1998年)欧州生化学誌258号:100~106頁(Yan, B. B., et al., (1998) Eur J Biochem 258: 100-6); クンケル, その他著(2001年)ウイルス学誌75号:2119~2129頁(Kunkel, M. et al., (2001) J Virol 75: 2119-29))。従って、このドメインを包含するHCVコア切断物は、完全キャプシドを無細胞系において組立てるはずである。組立反応を、C191、C115及びC124をコードする転写物を用いて設定した。合成物の全量は、3種の構築物全てにおいて同様であった。2.5時間にわたるインキュベーションの後に、反応産物を速度沈降により分析して、かつ100S粒子中に移動するコアの量を合成コア全量の%としてグラフに示した(以下の図15)。2種のC末端切断突然変異体は、全長コアと同様に100S粒子を組み立てた。組立に必要なドメインがHCVコアの最初の115個のアミノ酸中に局在するとの見解は、他の系における観察と一致するものである(マツモトその他著(1996年)ウイルス学218号:43~51頁(Matsumoto, et al., (1996) Virology 218: 43-51))。

20

30

【0114】

HCVコアの突然変異体を更に改変して、42~173番目のアミノ酸(N42)及び68~173番目のアミノ酸(N68)をコードさせた(図25)。野生型(WT)C173コア(1~173番目のアミノ酸)又は上記のN末端欠失突然変異体の転写物を使用して、無細胞翻訳及び組立反応を設定した。反応産物をスクロース勾配上での速度沈降により分析した。図25において左側のパネルは、無細胞組立反応物を野生型及び突然変異体のコア転写物を用いて設定して、かつ速度沈降により分離したものである。この分画をSDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより分析した。S値を分画の上部に示し、かつ黒塗りのバーは予想される位置、即ち完全に組立てられたキャプシドを示している。図25の右側のパネルは、100S分画に移動する放射能標識コアの量を、合成コアタンパク質全量の百分率(%組立率)として示すものであり、該百分率は左側のパネルのオートラジオグラフィのデンストメトリーにより測定した。野生型C173は、100Sキャプシド様構造物を極めて効率的に組み立てた。

40

【0115】

実施例13HCVキャプシドの組立が、規則的な中間体経路を介して進行する証拠

キャプシドの組立が組立中間体を介して生ずるかどうかを判断するために、パルスチェイス実験を無細胞系において実施した。無細胞反応物を野生型HCVコアを用いて設定し

50

て、³⁵S-システインを用いて3分にわたり標識して、かつ未標識システインを用いて追跡した。アリコートを示時間採り出して、かつ図15の記載と同様に2mlのスクロース勾配上での速度沈降により分析した。この分画をSDS-PAGEにより試験して、かつオートラジオグラフを定量した。グラフは、最上層分画1及び2(T)と、中間層分画6、7、及び8(M)と、沈殿層(P)中に存在するHCVコアタンパク質の量を示すものである。中間層分画は、100Sの完全HCVキャプシドに相当する。種々の大きさの複合体を介する標識コアポリペプチドの進行を、追跡反応の種々の時間で採り出されたアリコートの速度沈降により試験した。この結果は、キャプシドタンパク質が最初に勾配の最上層(おそらく二量体又は低重合体に相当する~10~20Sの複合体)に現れて、次いで巨大な組立中間体に相当する沈殿層に現れて、かつ最後に勾配の中間層(~100S)、即ち完全キャプシドの位置に現れることを示唆している。これらの結果は、キャプシドの組立が規則的な組立中間複合体経路を介して生ずることを示している。この沈殿物は最初に増加して、かつ次いで完全キャプシドが形成されるにつれて減少しており、このことは沈殿物中に高分子量の組立中間体が存在することを示している。

10

【0116】

実施例14

HCVコアタンパク質と宿主タンパク質とは、無細胞系において会合すると考えられる
他のウイルスキャプシド、例えばHIV-1及びHBVのキャプシドについての研究(上記を参照のこと)は、細胞内でのキャプシドの組立エネルギー依存性であり、かつ宿主因子を必要とすることを示唆している(リンガッパ, J.R. その他著(1997年)細胞生物学誌136号:567~581頁(Lingappa, J.R., et al., (1997) J. Cell Biol 136:567-81); リンガッパ, J.R. その他著(1994年)細胞生物学誌125号:99~111頁(Lingappa, J.R., et al., (1994) J Cell Biol 125: 99-111); ウエルドン, R.A. その他著(1998年)ウイルス学誌72号:3098~3106頁(Weldon, R.A., et al., (1998) J Virol 72: 3098-106); マリアーニ, R. その他著(2000年)ウイルス学誌74号:3859~3870頁(Mariani, R., et al., (2000) J Virol 74: 3859-70); マリアーニ, R. その他著(2001年)ウイルス学誌75号:3141~3151頁(Mariani, R. et al., (2001) J Virol 75: 3141-51); ウナトマツ, D. その他著、(1998年)免疫学研究10号:225~236頁(Unutmaz, D., et al., (1998) Sem in Immunol 10: 225-36)。細胞因子は更にHCVキャプシドの組立にも関与している。それというのも、全長コアが細胞因子の不存在下で組立てられると、細胞内で産生されたキャプシドに対して粒子の大きさ及び形状が異常な粒子がもたらされるからである(クンケル, その他著(2001年)ウイルス学誌75号:2119~2129頁(Kunkel, M. et al., (2001) J Virol 75: 2119-29))。

20

30

【0117】

無細胞系を使用してキャプシド形成に関与しうる宿主因子を探索すると、2つの仮説: 1) そのような因子はおそらく組立の間に一時的にコア鎖と会合すること、及び2) HCVキャプシドの組立に関与する宿主タンパク質候補は、例えば一般的な分類の分子シャペロン、特に真核細胞質ゾルのシャペロンであることが考えられた。真核細胞質ゾルのシャペロンTCP-1に対する抗体により認識されるタンパク質は、2種の異なるウイルス、即ちHBV(リンガッパ, J.R. 著(1994年)細胞生物学誌125号:99~111頁(Lingappa, J.R., (1994) J Cell Biol 125: 99-111))及びd型レトロウイルスであるメーゾンファイザーサルウイルス(M-MPV)ホン, S. その他著(2001年)ウイルス学誌75号:2526~2534頁(Hong, S., et al, (2001) J Virol 75: 2526-34)のキャプシドタンパク質と会合することが見出されている。これらの両方の研究においては、TCP-1が同時会合タンパク質として明確に同定されていないので、交差反応タンパク質という可能性を依然として除外することはできないことに留意のこと。これらの両方のウイルスのキャプシドは細胞質内で予め形成され、このことはC型レトロウイルス、例えばHIV-1のキャプシドとは異なっている(ウィルス及びクラベン著(1991年)Aids5号:639~654頁(Wills and Craven (1991) Aids5: 639-5

40

50

4)。

【0118】

HCVコアと分子シャペロンとの会合を探索するために、無細胞反応物を、HCVコア、HIV-1 Gag、又はHBVコアの何れかを用いて設定した。組立の間に、該反応物を未変性条件下で、TCP-1の種々のエピトープに対する抗血清(60-C、60-N、23c、及び91a)又は非免疫性血清(NI)を用いて免疫沈降(IP)させた。IP溶出物を、SDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより分析した。評価された全種の抗体は、1種を除いては、これらの組立反応物中ではHCVコア鎖を認識することができず、このことはほとんどの分子シャペロンは組立てられているHCVコア全長鎖と会合しないことを示唆している。しかしながら、真核細胞質ゾルのシャペロンTCP-1の特異的エピトープ(400~422番目のアミノ酸)に対する抗血清(60-C)は、未変性条件下でHCVコアを免疫共沈降させた(図16及び図17)。これらのデータは、TCP-1又はエピトープをTCP-1と共有するタンパク質の何れかと、HCVコア鎖とが無細胞系において会合することを示唆している。この抗血清により認識されるエピトープは、配列:

N末端-RGANDFMCDemersLHDA-C末端

に相当するものである。このエピトープは、様々な種から単離されたTCP-1間で高度に保存されている。更に、このエピトープは、細菌シャペロンGroEL領域に対する配列ホモロジーを有する。一般的に、GroELは、全体的な配列特異性をTCP-1とほとんど共有しないが、極めて類似の構造及び機能を有する(フリードハム, J. その他著(1992年)Embo誌11号:4767~4778頁(Frydham, J. et al., (1992) Embo J 11: 4767-78); ガオ, Y. その他著(1992年)セル誌69号:1043~1050頁(Gao, Y. et al., (1992) Cell 69: 1043-50); ルイス, V. A. その他著(1992年)ネイチャー誌358号:249~252頁(Lewis, V. A., et al., (1992) Nature 358:249-52); ロンメラレ, H. その他著(1993年)米国国立科学学術院の進展90号:11975~11979頁(Rommelaere, H. et al., (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90: 11975-9); ヤッフエ, M. B. その他著(1992年)ネイチャー誌358号:245~248頁(Yaffe, M.B. et al., (1992) Nature 358: 245-8))。60-C配列を使用してBLAST検索を行っても、60-C配列に対する著しい配列ホモロジーを有する他のいかなるタンパク質、更には様々な種由来のTCP-1サブユニットについても明らかにならない。

【0119】

TCP-1の他の領域に対する抗血清、例えば60-N(リングッパ, J. R. その他著(1994年)細胞生物学誌125号:99~111頁(Lingappa, J. R., et al., (1994) J Cell Biol 125: 99-111))、23c(ハynes, G. その他著(1996年)電気泳動17号:1720~1727頁(Hynes, G. et al., (1996) Electrophoresis 17: 1720-7); ウイリソン, K. その他著(1989年)セル誌57号:621~632頁(Willison, K et al, (1989) Cell, 57: 621-632)、及び91a(フリードマン, J. その他著(1992年)Embo誌11号:4767~4778頁(Frydman, J. et al., (1992) Embo J 11: 4767-78))は、HCVコアを免疫共沈降させることができない。これに対して、HBVコアは60-N抗血清(TCP-1中の42~57番目のアミノ酸に対する)(リングッパ, J. R. その他著(1994年)細胞生物学誌125号:99~111頁(Lingappa, J. R. et al., (1994) J Cell Biol 125: 99-111))により認識される。組立てられているHIVGag鎖は、(TCP-1中の最後の3個のアミノ酸を含有するエピトープを認識する)23c抗血清(リングッパ, J. R. その他著(1997年)細胞生物学誌136号:567~581頁(Lingappa, J.R. et al., (1997) J Cell Biol 136:567-81))により認識され、これを図17に示す。エピトープ認識のこれらの差異は、これらの各キャプシドタンパク質が異なる宿主タンパク質に結合するという可能性と合致するものである。選択的に、2種の無関連なウイルスのキャプシドタンパク質が、同一の細胞タンパク質に結合するのであれば(HBV及びHCVのコアの場合)、各

10

20

30

40

50

キャプシドタンパク質がそのタンパク質に特有の様式で結合すると予想される。それというのも、無関連なウイルスのキャプシドタンパク質は、相互に著しい配列ホモロジーを有さないからである。このように、種々のエピトープは、2種の無関連なキャプシドタンパク質が同一の細胞タンパク質に結合する際に明かされると考えられる。同時にこのデータは、種々のウイルスのキャプシドタンパク質が宿主タンパク質との特有の相互作用を組立の間に形成することを顕著に示している。

【0120】

実施例15

HBVコア無細胞翻訳産物は、速度沈降により3つの位置に移動する

放射能標識HBVコアポリペプチドを合成するために、HBVコアDNAをインビトロ
10
で転写させて、かつコムギ胚抽出物を含有する異種の無細胞系において120分にわたり
翻訳させた(実施例1を参照のこと)。放射能標識翻訳産物を、HBVコア多量体の形成
について10~50%のスクロース勾配上で20000gで1時間にわたり沈降させる
ことにより分析した。勾配の分画に続いて、放射能標識コアタンパク質の移動をSDS-
PAGE、クーマシー染色、及びオートラジオグラフィを使用して測定した。これらの条
件下では、12Sを下回る未標識タンパク質の標準物、例えばカタラーゼは最初の3つの
分画に移動した。組換えE・コリ内で産生された成熟コア粒子(基準キャプシドと言及す
るものとする)は、大部分が分画5~7(~100S)中に見出された。放射能標識され
た無細胞翻訳産物は、これらの勾配条件を使用すると図18に示すように3つの特徴的な
20
位置に移動することが判明した。勾配の最上層(T)の第1の領域は、単量体及び低重合
体のコアポリペプチドの位置に相当する一方で、勾配の中間層(M)中の第2の領域は基
準キャプシドの位置に相当する。沈殿層(P)中の第3の領域は、極めて高分子量の構造
物に相当する。沈殿層又は中間層の分画の何れかがリボソームから依然として放出され
ない完全鎖からなるという可能性は、翻訳産物を合成完了後に、リボソームを分解する
ことが知られているEDTA(サバチーニその他1966年(Sabatini et al., 1966))で
処理することにより除外された。沈殿層及び中間層の分画は、両方ともEDTA処理によ
っては大部分が影響を受けなかった(データ示さず)。全体として考えると、これらの結
果は、キャプシド様粒子が新たに合成されたコアポリペプチドからこの無細胞系において
組立てられているという可能性を提起するものであった。

【0121】

無細胞系で産生されたキャプシドの信頼性を確認するために、関連する分画をEMにより
30
試験した。HBVコアの無細胞翻訳産物(図24、無細胞)及び無関連なタンパク質(
GRP94)の無細胞翻訳産物(図24 対照)並びに組換えHBVキャプシド(図24
、基準)をEDTAで処理してリボソームを分解させて、かつ次いでCsCl勾配上で平
衡遠心した。これらの各勾配の分画6及び7を回収して、かつAirfuge機中で濃縮
した。顕微鏡使用者により単純盲検法を用いて試験された再懸濁沈殿物の電子顕微鏡写真
により、基準キャプシドと区別不能なHBVコア無細胞翻訳産物の粒子が明らかになった
。これに対して、無関連なタンパク質の無細胞翻訳物の同等の分画中においては類似のキ
ャプシドは見られなかった。このように、4つの基準-速度沈降、浮遊密度、プロテアー
ゼ耐性(データ示さず)、及び電子顕微鏡により、HBVコア翻訳産物の一部は真正のH
40
BVキャプシドを組立てる。

【0122】

図18に記載されるスクロース勾配の最上層、中間層、及び沈殿層中での標識コアポリ
50
ペプチドの出現順を決定するために、無細胞翻訳を[³⁵S]システインの10分のパルス
を使用して実施して、続いて過剰な未標識システインの存在下で時間の長さを変動させ
て追跡した。翻訳産物をスクロース勾配を介して沈降させて、かつSDS-PAGE及び
オートラジオグラフィにより分析した。10分の追跡時間、即ち実質的に全ての標識鎖が
完全に翻訳された時間の後に、標識システインの存在下で合成された鎖の群は、大部分が
勾配の最上層に見出された(図19A)。追跡時間を35分まで延長すると、相当量のこ
の物質が勾配の沈殿層及び中間層中に見出された(図19B)。続いての50分の追跡時

間においては、標識鎖は勾配の最上層にほとんど存在しなかった。逆に、標識量は分画の沈殿層及び中間層中で増加して蓄積した(図19C)。170分の追跡時間の後には、中間層中の放射能標識物質の量は更に増加し、その際、勾配の沈殿層及び最上層の両方の標識物質は減少した(図19D)。オートラジオグラフを相応のゲルに隣接して示し、該オートラジオグラフの定量により、勾配の最上層中の標識物質が経時的に劇的に減少することを確認した。沈殿層中の物質は最初に増加し、かつ次いで減少した一方で、中間層中の物質は追跡時間の過程にわたり次第に蓄積した。このようにこのデータは、新たに合成されたコアポリペプチドは経時的にHBVキャプシドを追求し、かつこれらはおそらく、少なくともある程度は沈殿層内に含まれる高分子量の複合体を介して追求することを示している。沈殿層が完全キャプシドの形成における中間体を含有することの決定的な確証を、

10

【0123】

実施例16CC60と、HBVキャプシドの組立における中間体とが会合する

TCP-1のペプチド配列に対するウサギポリクローナル抗血清(抗60)を生成させた(図20A)。他の研究者らの研究は、TCP-1が~60kDのタンパク質であり、20S粒子として移動することを示している(ガオその他、1992年(Gao et al., 1992)); ヤッフエその他、1992年(Yaffe et al., 1992))。本件の抗60抗血清は、安定状態の標識HeLa細胞の全抽出物から単一の60kDタンパク質を変性条件下で免疫沈降させた(図19B、レーン1)。同一の60kDタンパク質は、抗60により未変性条件下で免疫沈降された(マルチン、R.及びW.J.ヴェルヒ(Martin, R., and W.J. Weich)著の原稿、調製項目)。ウサギ網状赤血球又はコムギ胚抽出物の何れかについて10~50%のスクロース勾配上で分画した際に、抗60反応物質は20S粒子として移動し、このことは勾配分画(図20C、最上層及び底層それぞれ)のイムノプロットティングにより明らかになった。更に、上記のTCP-1に対する抗体により認識されることが知られている20S粒子の60kDポリペプチド成分(網状赤血球溶解物から精製)(ウイリソンその他、1989年(Willison et al., 1989))はまた、本出願中に記載された抗60抗血清に対して反応する(Hシュターンリヒト氏、個人的情報)。これに対して、ミトコンドリアhsp60は、抗60によっては認識されなかった(データ示さず)。抗60により認識されるこの20S粒子はまた、好熱性古細菌スルフォロブス・シバタエ(*Sulfolobus shibatae*) 20に見出されたhsp60ホモログであるTF55に対する抗体(J.トレント氏(J. Trent)、アルゴンヌ国立研究所(アルゴンヌ、イリノイ)(トレントその他、1991年(Trent et al., 1991))を参照のこと)により提供された)により認識された(データ示さず)。このように、抗60はTCP-1、又はこれと密接に関連し、C60と言及される真核細胞質ゾルタンパク質の何れかを認識していると考えられる。

20

30

【0124】

CC60とHBVコアとが無細胞組立系において会合するかどうかを判断するために、抗60(図21、60)がスクロース勾配の種々の分画からの新たに合成されたHBVコアポリペプチドを共沈降させることができるかどうかを試験した。対照の免疫沈降を、非免疫性血清(図21、N)及びHBVコアポリペプチドに対するウサギポリクローナル抗血清(図21、C)を使用して実施した。図21Aは、未変性条件下でかつ60がスクロース勾配の中間層(M)及び沈殿層(P)内に存在する放射能標識コアポリペプチドを共沈降させたが、最上層(T)からのコアポリペプチドを共沈降させなかったことを示すものである。同様に、TF55に対する抗体(上記参照のこと)は、勾配の沈殿層及び中間層中のコアポリペプチドを共沈降させた(データ示さず)。免疫沈降を、試料をSDS中で沸騰させることにより変性させた後に実施した際には、予想通り抗60はこれらの何れの勾配分画からのコアポリペプチドをも共沈降させなかった(図21B)。これに対して、コアポリペプチドに対する抗血清は、これらの全3種の分画中の標識コアタンパク質を、未変性及び変性の両方の条件下で認識した(図21、A及びB)。これらの観察に基づ

40

50

くと、CC60はHBVコアタンパク質の未組立形態とは会合しないが、このタンパク質の多量体形態とは会合すると考えられる。これらの結果は、CC60がHBVコア粒子の組立において役割を果たすという可能性を提起するものであった。

【0125】

CC60が組立において役割を果たすのであれば、一度組立が完了するとこのシャペロニンは多量体コア粒子から解離すると予想することができる。この仮説を検証するために、スクロース勾配の中間層から更にCsCl勾配上で分画された物質について免疫沈降を実施した。そのような平衡遠心法を使用すると、成熟キャプシドを分離することができ(CsCl勾配の分画1~4中に見出される)、そして該キャプシドはおそらく不完全な組立中間体である。図21Cは、未変性条件下では、抗60がCsCl勾配からの分画3中に存在するHBVコアポリペプチド(不完全なキャプシドに相当する)を共沈降させるが、同一勾配からの分画6中に存在するコアポリペプチド(完全キャプシドに相当する)を沈降させないことを示すものである。コアポリペプチドに対する抗血清は、両方の分画中のコアタンパク質を認識する。このように、CC60は部分的に組立てられたキャプシドとは会合するが、成熟キャプシドとは会合しないと考えられる。

10

【0126】

CCとコアポリペプチドとが組立のプロセスにおいて一時的に会合するにすぎないことの更なる確証として、勾配分画についてのイムノプロットをCC60に対する抗血清を用いて翻訳の間の種々の時間で実施した(リンガッパ, J. R., W. J. ヴェルヒ及びV. R. リンガッパ(Lingappa, J.R., W.J. Welch, and V.R.Lingappa)の原稿、調製項目

20

【0127】

実施例17

HBVコアポリペプチドの産生とコア粒子の組立とを脱共役させることができる

コア単量体の折りたたみにおけるCC60の役割と、多量体の組立におけるCC60の役割とを区別するために、コアポリペプチドの産生とコア粒子の組立とを脱共役させることを試みた。アフリカツメガエル卵母細胞内においては、コア粒子の組立がコアポリペプチド鎖の濃度に極めて依存していることが知られている(ザイファーその他、1993年(Seifer et al., 1993))。本件の系においても同様に顕著な濃度依存性が観察された。HBVコア転写物の濃度を本件の無細胞系において使用される標準濃度の50%以下に減少させた際には、全てのコアポリペプチド合成がほぼ直線的に減少するとともに(データ示さず)HBVキャプシドの組立が実質的に廃された(図22A)。これらの条件により、未組立の全長コアポリペプチドが上記のスクロース勾配の最上層に移動し、その集団が蓄積した(図22A)。これらの未組立鎖は、長時間(6時間)にわたりインキュベートされた場合でさえ勾配の最上層に残留し、このことは組立がこれらの条件下では低速度でさえも生じないことを示している(データ示さず)。未組立コアポリペプチドは、5~25%のグリセロール勾配上で遠心分離された際に、タンパク質標準物の位置に基づいて折りたたまれたコアの球状二量体と予想される領域の近傍に移動した(データ示さず)。このようにこのデータは、勾配最上層の未組立物質が折りたたまれていないポリペプチドからは構成されていないことを示している。逆に、この物質はおそらくコアポリペプチド二量体、又は単量体と二量体との混合物に相当する。この二量体は、インビボにおいてキャプシド組立前駆体であることが知られている(チョウ及びスタンディング、1992年(Zhou and Standring, 1992))。

30

40

【0128】

勾配の最上層に存在する未組立コアポリペプチドが、実際にキャプシド組立能を有するかどうかを判断するために、該ポリペプチドをキャプシド中で過剰の未標識コア鎖の存在

50

下で追跡することができるかどうかを調べた。これを実施するために、これらの未組立の放射能標識鎖に、100%のコア転写物を用いて45分にわたり設定された過剰の未標識翻訳混合物を添加した。45分の時点を選択したのは、この時点が新たに合成されたコア鎖が本件の標準スクロース勾配の最上層、中間層、及び沈殿層領域中にほぼ等しい割合で存在する時点に相当するからである(データ示さず)。未組立の標識鎖と未標識翻訳物とを混合した後に、インキュベーションを24で45分又は120分の何れかで継続させて、かつ次いでこの混合物を上記と同様にスクロース勾配上に重層して、遠心分離して、分画して、かつSDS-PAGE及びオートラジオグラフィにより分析した。45分のインキュベーションの後に、標識ポリペプチドは主として沈殿層(P)中に、少量で勾配の中間層(M)中に見出された一方で(図22B)、120分後には相当量の標識鎖が勾配の中間層(M)中に存在した(図22C)。そのスクロース勾配の中間層からの物質(図22C)を、引き続いてCsCl上で遠心分離した際には、放射能標識鎖は基準コア粒子と同程度に移動することが判明し、このことは完全キャプシドがこの追跡の間に産生されることを裏付けるものであった(データ示さず)。

10

【0129】

未標識擬似翻訳物を45分にわたりプレインキュベートして、かつ未組立コアポリペプチドに添加した際には、勾配最上層の放射能標識コアポリペプチドは沈殿層又は中間層の何れにも巡ることはなかった(図22D)。無関連なタンパク質であるウシプロラクチンを用いて設定された翻訳物を未組立コアポリペプチドに添加した際にも、同様の結果が得られた。同様に、標準の50%のコア転写物の未標識翻訳物を未組立の放射能標識コアポリペプチドに添加した際には、放射能標識鎖は勾配の最上層で残留した(データ示さず)。後者の実験においては、HBVコア鎖の濃度は標準濃度の50%で維持されたので、組立に必要な閾値まで上昇することはなかった。このように、未組立鎖は適切な条件下で成熟キャプシド形成能を有すると考えられる。

20

【0130】

実施例18

完全キャプシドを単離沈殿物の操作により放出させることができる

CC60と多量体の複合体との会合が判明したので、これらの複合体が最終キャプシド産物の組立において中間体を構成するかどうか、及びエネルギー基質がそのような中間体の進行において役割を果たすかどうかを判断することが望まれた。分子シャペロンは、誤って折りたたまれたタンパク質の凝集体の可溶化並びに上記したようにポリペプチドの正規の折りたたみ及び組立の促進に参与することが知られている。このようにCC60は、沈殿層及び中間層の分画中の多量体の複合体と会合する。それというのも、これらの複合体が誤って折りたたまれた又は誤って組立てられたタンパク質の凝集体からなる“行き止まりの経路”に相当するか、又はこれらの複合体が完全キャプシドの組立に向かう経路の途中の増殖性中間体に相当することの何れかであるからである。この件に取り組むために、沈殿物質を、HBVコアの30分の翻訳産物をスクロース勾配上で分画して、かつこの沈殿物を緩衝液中で再懸濁することにより単離した。この再懸濁沈殿物を等量のアリコートに分割して、かつアピラーゼ又は緩衝液の何についても90分にわたり24で処理した。沈殿物からの放射能標識物質は、アピラーゼ処理物については中間層まで巡ったが(図23A、上段)、緩衝液中でのインキュベーション物については中間層までは巡らなかった(図23A、下段)。分画6及び7をアピラーゼ処理後に回収して、かつCsCl勾配上で平衡に達するまで遠心分離した際には、ほとんどの放射能標識物質が基準コア粒子と同程度に移動することが判明した(データ示さず)。このように、単離された沈殿物質をアピラーゼ処理すると、この沈殿物から完全キャプシドが放出される。

30

40

【0131】

単離沈殿物を無細胞翻訳で使用されるエネルギー混合物(ATP、GTP、及びクレアチンリン酸を含有)を用いてコムギ胚抽出物と共に処理した際には、この沈殿物中の放射能標識コアポリペプチドは中間層及び最上層の分画の両方に巡ることが判明した(図23B、上段)。再度、中間層中の放射能標識物質を平衡沈降により試験した際には、小部分

50

が基準キャプシドと同一の浮遊密度を有した（データ示さず）。単離沈殿物をコムギ胚抽出物又はエネルギー混合物の何れかで単独で処理すると、極めて少量の放射能標識物質が勾配の中間層まで巡った（データ示さず）。単離沈殿物をアピラーゼ及びコムギ胚抽出物を用いて処理すると（図 2 3 B、下段）、アピラーゼ単独での処理と同様の結果が得られた（図 2 3 A、上段）。このように、エネルギー基質を添加すると、未組立コアポリペプチド及び組立てられたキャプシドが両方とも沈殿物から放出される。追加的なデータは、ポリソームが沈殿物中において機能しないことを示すものであった：（a）タンパク質合成阻害剤エメチンは、単離沈殿物のエネルギー基質又はアピラーゼでの処理結果に影響を及ぼさなかった；そして（b）上記に挙げたように、翻訳産物の 10 mM の EDTA での処理は、勾配の最上層、中間層及び沈殿層領域での標識コアポリペプチドの相対的な分布に対して影響を及ぼさなかった（データ示さず）。エネルギー基質の種々の操作を伴ってこの沈殿物の完全キャプシド追求能は、この沈殿物中の幾つかの物質が完全キャプシドへの経路内において中間体を構成することを示している。

10

20

40

50

【 0 1 3 2 】

実施例 1 9

ウイルス科と宿主細胞タンパク質とを相互参照させるライブラリーの作成

宿主細胞タンパク質と特定のウイルス科とを相互参照させるライブラリーを、実施例 1 に記載された無細胞系及び速度沈降を使用し形成されたキャプシド組立中間体を分離して、各ウイルス科の少なくとも 1 種のメンバーのキャプシドを調製することにより製作する。その際に、既知の宿主シャペロンに対して生成された抗体を使用して、組立中間体をスクリーニングした。そのようなシャペロンの例は、例えば TCP - 1、HP 6 8、又は CC 6 0 である。

【 0 1 3 3 】

第 2 表

【 0 1 3 4 】

【表 2】

宿主タンパク質の特性

ウイルス	宿主タンパク質	抗体	キャプシド タンパク質	組立中間体 (及びキャプシド) 沈降係数
レンチウイルス (HIV-1, HIV-2, SIV)	HP68	TCP-1 (23c)	Gag, pol, vif	10S, 80S, 150S, 500S (750S)
HCV		TCP-1 (60-C)		10-20S, 多数 (100S)
HBV	CC 60 hsp90	TCP-1 (60-N) TF55		20S, 多数 (100S)
M-MPV		TCP-1		

30

50

【 0 1 3 5 】

全種のウイルスの生活環における普遍的な段階の 1 つは、キャプシドの形成である。上記結果が示しているように、種々の科からの多様なウイルスについては、キャプシドの組立は自発的なものではなく、むしろ宿主タンパク質の作用により触媒されるものであり、かつ組立中間体を介して生ずるものである。今までのところ研究されたウイルスの種々の

各分類の宿主因子及び組立中間体の両方において特徴的な、絶対的で定型化されたキャプシド組立経路が存在する。これらの発見がなされた無細胞翻訳系は、ウイルスそれ自体を伝播又は増殖させるのに必要な条件を考慮することなく、ウイルスがどの宿主タンパク質を利用するのかという決定に基づいて、いかなるウイルスの脱構築をも付与するものである。更に、その系において組立中間体を検出及び富化することができる。宿主タンパク質及び組立中間体は両方とも有望な抗ウイルスの標的候補であり、このことはそのような1種の宿主タンパク質の優性阻害型突然変異体の発現がウイルスの感染細胞からの放出を終了させるという証拠が1例において示されている。このように、キャプシドの組立に關与するこれらの宿主タンパク質又は中間体の変化を妨害する小分子薬剤形態の抗キャプシド療法剤は、ウイルスの脅威に対する迅速な対応についての新たな有望な方針であり、たとえウイルスが同定される前、及び/又はウイルスの培養能が設定される前でさえ効果的であるとわかる。このキャプシド組立段階は、事前に抗ウイルス療法の標的とはならなかった。それというのも、キャプシドは“自己組立”により自発的に形成されるので、キャプシドは特定のタンパク質を標的としないと考えられていたからである。

10

【0136】

引用された全ての参考文献は、参照をもって開示されたものとし、全体として説明されたものとする。

【0137】

前記発明を、理解を鮮明にする目的のための説明及び実施例として幾分詳細に記載したが、所定の変法及び改変を添付の請求項の範囲内で実践することができることは明白である。

20

【図面の簡単な説明】

【0138】

【図1】ウイルスキャプシドの組立のための無細胞系の図を示すものである

【図2】無細胞系及び細胞系において形成されたHIVキャプシドの速度沈降勾配上での移動を示すものである

【図3】無細胞反応混合物中におけるHIVキャプシド組立の速度沈降によるパルスチェイス分析を示すものである

【図4】68kDの宿主タンパク質は無細胞系において選択的にHIV-1Gagと会合することを示すものである

30

【図5】HP68とHIV-1キャプシド組立中間体とが会合することを示すものである

【図6】WGH P68のアミノ酸配列を示すものである

【図7】切断されたHP68はビリオン産生を遮断することを示すものである

【図8】HuHP68は哺乳動物細胞内においてHIV-1Gagを免疫共沈降させることを示すものである

【図9】HuHP68はHIV-1Gag及びVifを免疫共沈降させるが、Nef又はRNアーゼLを免疫共沈降させないことを示すものである

【図10】HP68は哺乳動物細胞内においてHIV-1Gagにより漸増されることを示すものである

【図11】HuHP68は哺乳動物細胞内においてHIV-1Vifを免疫共沈降させるが、RNアーゼLを免疫共沈降させないことを示すものである

40

【図12】Cos-1細胞において、HP68はHIV-1及び2種の初代単離物由来のHIV-2のGagと会合するが、CA/NC結合部で切断されたHIV-1Gag又はHIV-2Gagの突然変異体とは会合しないことを示すものである

【図13】無細胞系において組立てられたHCV及びHBVのコアの速度沈降を示すものである

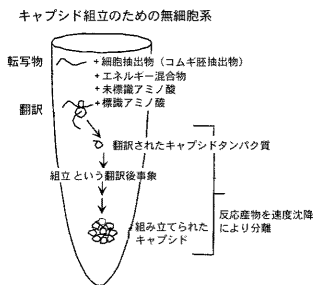
【図14】無細胞系において産生された100Sの粒子がHCVキャプシドと予想される浮遊密度を有することを示すものである

【図15】コアの親水性相互作用ドメインを含有する突然変異体が無細胞系において組立てられることを示すものである

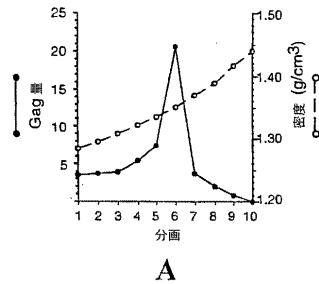
50

- 【図16】 HCVコアの免疫共沈降のための戦略を示すものである
- 【図17】 HCVコアの60-C抗血清による免疫共沈降を示すものである
- 【図18】 HBVコアの無細胞翻訳産物のスクロース勾配分画を示すものである
- 【図19】 HBVコア粒子の組立のパルスチェイス分析を示すものである
- 【図20】 細胞質ゾルのシャペロニンに対するポリクローナル抗血清の調製及び特性決定を示すものである
- 【図21】 HBVコアの翻訳産物の免疫沈降を示すものである
- 【図22】 未組立コアポリペプチドが多量体粒子内で追跡され得ることを示すものである
- 【図23】 完全キャプシドが単離された沈殿物から放出されることを示すものである
- 【図24】 無細胞系で産生されたキャプシドの電子顕微鏡写真を示すものである
- 【図25】 HCVコアのN末端欠失突然変異体は無細胞系において組立てられないことを示すものである

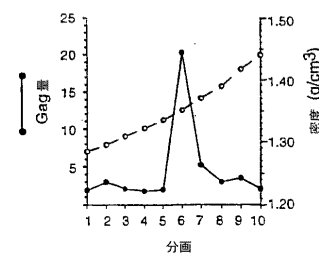
【図1】



【図2】

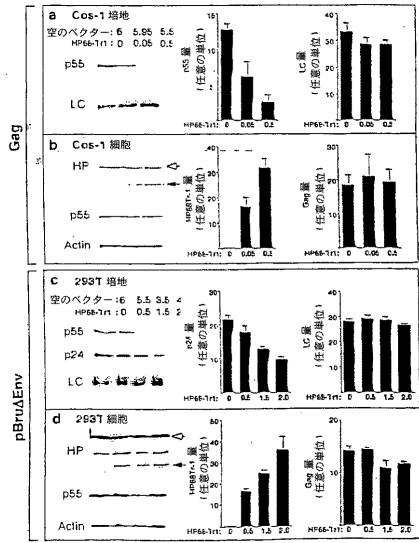


A

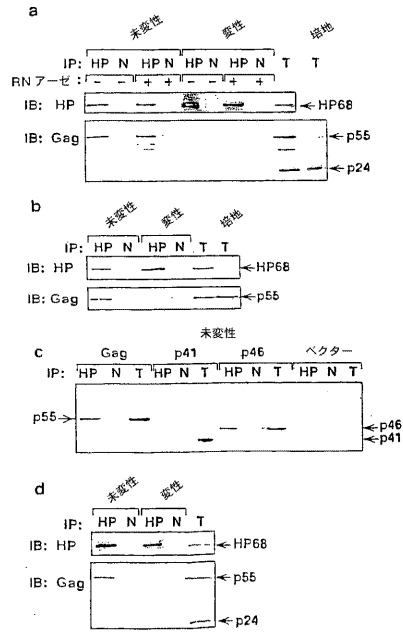


B

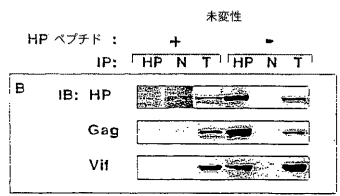
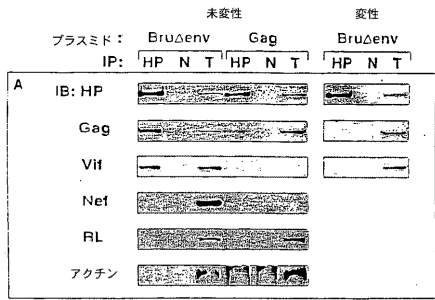
【 図 7 】



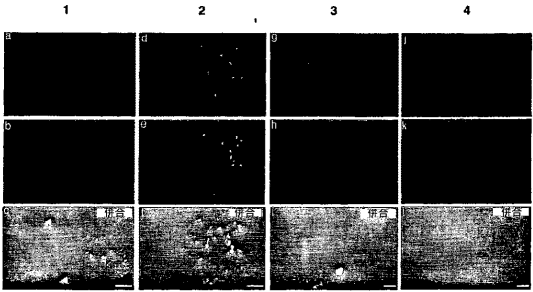
【 図 8 】



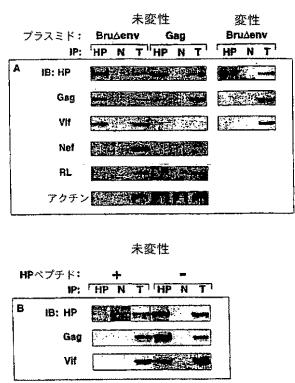
【 図 9 】



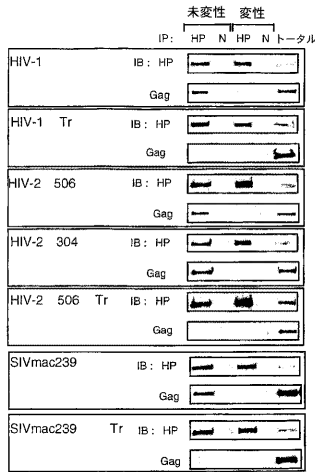
【 図 10 】



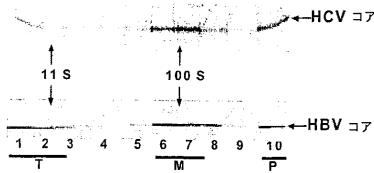
【 図 11 】



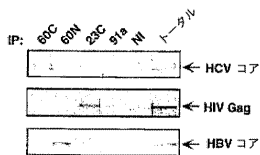
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

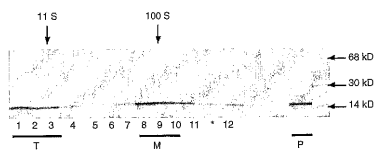


【 図 1 7 】

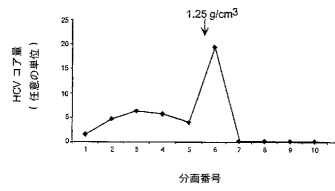


【 図 1 8 】

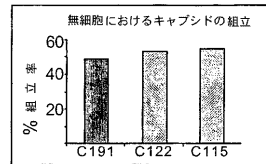
pure 18



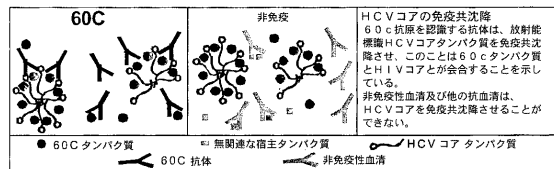
【 図 1 4 】



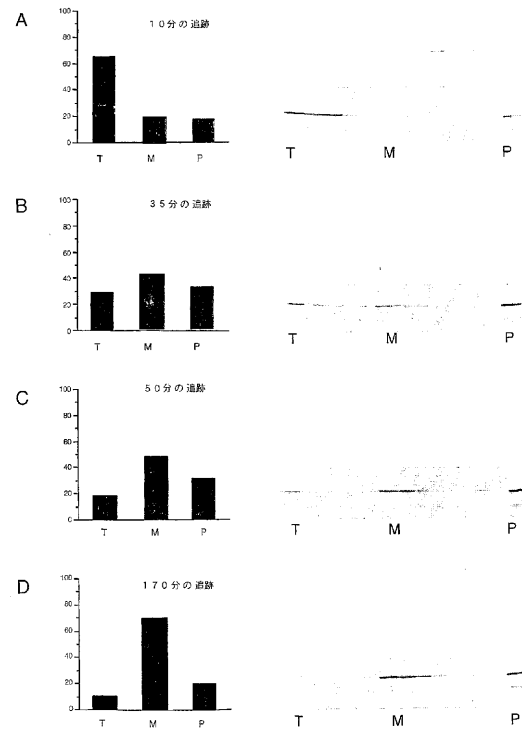
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 9 】



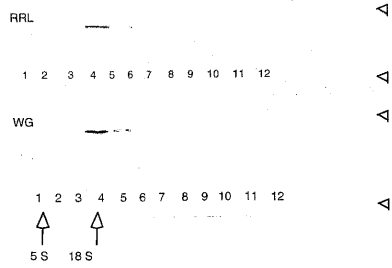
【 図 2 0 】

A マウス *TCP1* *D K M L V D D I G D V T I T N D*
TF 55 *. . . F . . S L . . I*
 酵母 *TCP1* *. F . V*

B

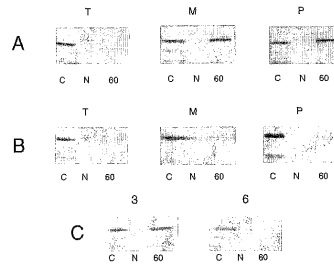


C



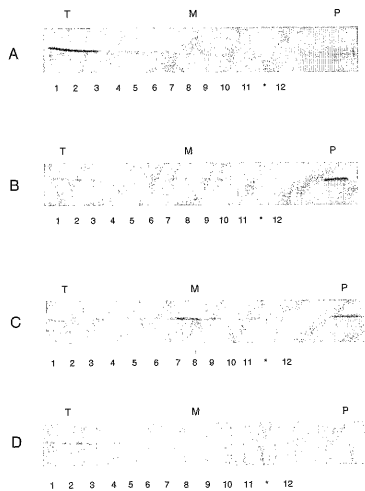
【 図 2 1 】

Figure 21



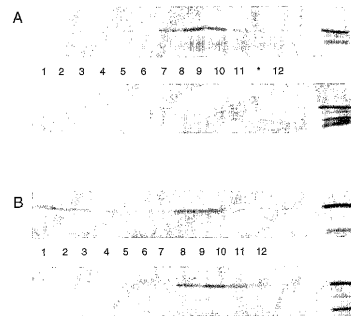
【 図 2 2 】

Figure 22

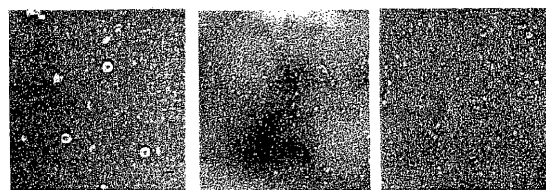


【 図 2 3 】

Figure 23



【 図 2 4 】

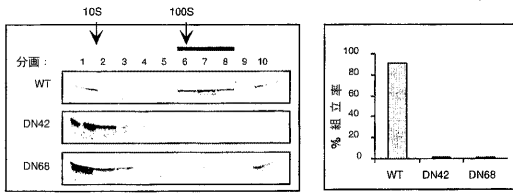


無細胞

基準

対照

【 図 2 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/28622		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : C 12N 7/00 US CL : 435/235.1 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) U.S. : 435/5, 7.1, 183, 235.1; 536/23.1				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Pubmed				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	SAKALIAN. M. Synthesis and Assembly of Retrovirus Gag Precursors into Immature Capsids In Vitro Journal of Virology, June 1996, Vol. 70, No. 6, Abstract, pages 3707, 3708	1-7, 9-11, 15, 19, 24-26		
---		8, 16-18		
Y	BOLLENGIE. F. Peptide mapping of mammalian brain protein h3 in subsets of tissues and ligand binding studies Arch Int Physiol Biochim Biophys, January-February 1993, Vol. 101, No. 1, Abstract	12		
Y	US 5,750,394 (PALESE et al) 12 May 1998 (12.05.1998) Abstract, column 3, lines 29-51, column 12, lines 8-16	13, 14, 16, 17, 18		
Y	BEATCH. M.D. Rubella Virus Capsid Associates with Host Cell Protein p32 and Localizes to Mitochondria Journal of Virology June 2000, Vol. 74, No. 12, pages 5569-5574	13, 14		
A	SOOCHUL. P. The Eek receptor, a member of the Eph family of tyrosine protein kinases, can be activated by three different Eph family ligands. Oncogene, 1997, vol. 14, pages 533-542.	20-23		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 another 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 </td> <td style="width: 50%;"> "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 </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 another 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 another 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 04 March 2004 (04.03.2004)		Date of mailing of the international search report 19 JAN 2005		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Tim Brown <i>Janice Ford for</i> Telephone No. (571) 272-1600		

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/005	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/08	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/70	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 21/78	C 1 2 Q 1/70	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/48	P
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/53	Y
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/569	G
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 501476498
 センターズ フォー ディズィーズ コントロール アンド プレヴェンション
 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION
 アメリカ合衆国 3 0 3 4 1 ジョージア州 アトランタ ブフォード ハイウェイ 4 7 7 0

(74) 代理人 100061815
 弁理士 矢野 敏雄

(74) 代理人 100094798
 弁理士 山崎 利臣

(74) 代理人 100099483
 弁理士 久野 琢也

(74) 代理人 100114890
 弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72) 発明者 ジャイスリ アール リンガッパ
 アメリカ合衆国 ワシントン シアトル イー ジョーン ストリート 1 7 0 1

(72) 発明者 ジャイラム アール リンガッパ
 アメリカ合衆国 ジョージア アトランタ オルダールブルック ロード 1 7 1 2

(72) 発明者 ヴィシュワナス アール リンガッパ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア サンフランシスコ パチエコ ストリート 6 2 6

F ターム(参考) 2G045 BB24 CB01 FB03 FB08
 2G054 AA08 AB04 BB08 EA03
 4B024 AA01 AA11 BA32 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 DA02
 EA04 FA02 FA10 GA03 GA11 GA18 GA27 HA03 HA08 HA09
 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR43 QR46

	QR48	QR49	QR59	QR66	QR69	QR77	QR79	QR80	QS12	QS13
	QS16	QS17	QS24	QS28	QS36	QX02	QX07			
4B064	AG01	AG27	CA10	CA19	CA20	CC24	CC30	CD20	CE12	DA01
	DA13									
4C084	AA17	NA14	ZB331	ZC511	ZC611					
4C085	AA14	BA51	DD62							
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	CA01	CA40	DA76	DA86	EA29
	EA50	EA53	FA72	FA74	GA26					

专利名称(译)	通过体外装配衣壳来分解病毒		
公开(公告)号	JP2005538716A	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2004536174	申请日	2003-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会 华盛顿大学		
申请(专利权)人(译)	盐湖城加州摄政 盐湖城华盛顿 中心头昏眼花的控制和预埃因霍温化		
[标]发明人	ジャイスリアルールリングッパ ジャイラムアールリングッパ ヴィシュワナスアールリングッパ		
发明人	ジャイスリ アール リングッパ ジャイラム アール リングッパ ヴィシュワナス アール リングッパ		
IPC分类号	G01N33/48 A61K39/395 A61K45/00 A61P31/12 C07K14/005 C07K14/02 C07K14/15 C07K14/16 C07K14/18 C07K14/47 C07K16/08 C07K16/18 C12N7/00 C12N7/04 C12N15/09 C12P21/02 C12P21 /08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33 /569		
CPC分类号	C07K14/005 C07K16/1054 C12N7/00 C12N2730/10122 C12N2730/10123 C12N2740/12023 C12N2740 /15022 C12N2740/15023 C12N2740/16023 C12N2740/16122 C12N2740/16222 C12N2740/16322 C12N2770/24222 C12N2770/24223		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.S A61K45/00 A61P31/12 A61P31/12.171 C07K14/005 C07K14/47 C07K16/08 C07K16/18 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.Z C12Q1/70 G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/48.P G01N33/50.Z G01N33/53.Y G01N33/569.G C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/FB03 2G045/FB08 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/BB08 2G054 /EA03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA03 4B024 /GA11 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063 /QR43 4B063/QR46 4B063/QR48 4B063/QR49 4B063/QR59 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS12 4B063/QS13 4B063/QS16 4B063/QS17 4B063/QS24 4B063 /QS28 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CC30 4B064/CD20 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084 /AA17 4C084/NA14 4C084/ZB331 4C084/ZC511 4C084/ZC611 4C085/AA14 4C085/BA51 4C085 /DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/EA53 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045 /GA26		
代理人(译)	矢野俊夫		
优先权	60/410572 2002-09-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

翻译和病毒衣壳和衣壳中间的组件的无细胞的方法公开了一种用于在未知病毒解构使用，以及用于抑制未知病毒的病毒衣壳的组装化合物的筛选。

ウイルス	宿主タンパク質	抗体	キャプシド タンパク質	組立中間体 (及びキャプシド) 沈降係数
レンチウイルス (HIV-1, HIV-2, SIV)	HP68	TCP-1 (23c)	Gag, pol, vif	10S, 80S, 150S, 500S (750S)
HCV		TCP-1 (60-C)		10-20S, 多数 (100S)
HBV	CC 60 hsp90	TCP-1 (60-N) TF55		20S, 多数 (100S)
M-MPV		TCP-1		