

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-224798

(P2004-224798A)

(43) 公開日 平成16年8月12日(2004.8.12)

| | | |
|-----------------------------|----------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C07K 14/15 | C07K 14/15 ZNA | 4B024 |
| C07K 19/00 | C07K 19/00 | 4B050 |
| C12N 9/38 | C12N 9/38 | 4H045 |
| GO1N 33/569 | GO1N 33/569 L | |
| // C12N 15/09 | C12N 15/00 A | |
| 審査請求 有 発明の数 11 O L (全 31 頁) | | |

| | | | |
|--------------|-------------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2004-76079 (P2004-76079) | (71) 出願人 | 594078353 |
| (22) 出願日 | 平成16年3月17日 (2004.3.17) | | セントコア インコーポレーテッド |
| (62) 分割の表示 | 特願2002-137039 (P2002-137039) の分割 | | アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 マル バーン グレート バリー パークウェイ 200番 |
| 原出願日 | 昭和60年10月11日 (1985.10.11) | (74) 代理人 | 100089705 |
| (31) 優先権主張番号 | 659339 | | 弁理士 社本 一夫 |
| (32) 優先日 | 昭和59年10月10日 (1984.10.10) | (74) 代理人 | 100075236 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 栗田 忠彦 |
| (31) 優先権主張番号 | 693866 | (72) 発明者 | ナンシー・ティー・チャン |
| (32) 優先日 | 昭和60年1月23日 (1985.1.23) | | アメリカ合衆国ペンシルバニア州1930 1, パオリ, シュガータウン・ロード 1 504 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

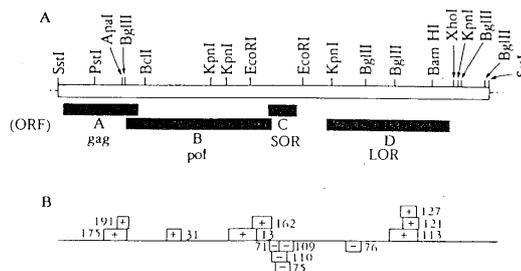
(54) 【発明の名称】 HTLV-I II DNAのクローニングおよび発現

(57) 【要約】

【目的】 HTLV-I II DNAのクローニングに基づいて、エイズの診断、治療および予防に有用な方法を提供する。

【構成】 HTLV-I II cDNAを含む組換えベクターを用いて形質転換した細胞により発現される免疫反応性HTLV-I IIポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法、HTLV-I II遺伝子をコードする単離されたcDNA、HTLV-I IIウイルスに特異的なHTLV-I IIゲノムの部分と本質的に相同であるDNA配列からなるDNAプローブ、およびHTLV-I IIポリペプチドが少なくとも1つの他のポリペプチドに結合してなるハイブリッドタンパク質。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項1】

HTLV-IIIのenv/env-lor DNA由来であり、且つ、図3～図14の塩基配列中の

【化1】

GAATTCGCAACAACTGCTGTATTATOCATTTTCAGAATTGGGTGTGGACATAGCAGAAATAGGCGTTACTGACA 5396
GAGGAGCAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCATAAAACTG 5471
CTTGTAOCAAATGCTATTGTA AAAAGTGTGCTTTTCATTGCOCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCT 5546
CCTATGGCCAGGACAGCGGACACAGGACGAGACCTCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAA 5621
AGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATACAAAATAGCAATAGTAGCATTTAGTAGTAGCAATAATAATAGCAA 5696
TAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAAATATAGGAAAATATTAAGCAAAAGAAAATAGACAGGTTAATTGATA 5771
GACTAATAGAAAGAGCAGCAAGCAGTGGCAATCAGAGTGAAGGCAAAATATCAGCACTTGTGGAGATGGGGTGG 5846
AGATGGGGCACCATGCTCCTGGGATGTTGATGATCTGTAGTGTACAGAAAATTTGGGGTCCACAGTCTATTAT 5921
GGGGTACCTGTGTGGAAGCAAGCAACCACCTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCATAATGATACAGAGGTA 5996
CATAATGTTTGGGCCACACATGCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAGAAAGTAGTATTGGTAAATGTGACA 6071
GAAAATTTTAAACATGTGCAAAAATGACATGGTAGAACAGATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATCAAAGC 6146
CTAAAGCCATGTGTAAATTTAACCCACCTCTGTGTGTAGTTTAAAGTGCACCTGATTTGAAGAATGATACTAATACC 6221
AATAGTAGTAGCGGAGAAATGATAATGGAGAAAGGAGAGATAAAAAACTGCTCTTTCAATATCAGCACAGCATA 6296
AGAGGTAAGGTGCAGAAAGAATATGCAATTTTATATAAACTTGCATATAATAACCAATAGATAATGATACTAOCAGC 6371
TATACGTTGCAAGATTGTAAACCTCAGTCATTTACACAGGCGCTGTCCAAGGTATCCTTTGAGCCAAITTOCCATA 6446
CATTTATTGTGCCCCGGCTGGTTTGGGATTTCAAATGTAATAAAGAGGTTCAATGCAACAGGACCATGTACA 6521
AATGTCAGCACAGTACAAATGTACACATGGAATTAGGCCAGTAGTATCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTG 6596
GCAGAGAAGAGGTAGTAAATAGATCTGCCAATTTACACAGCAATGCTAAAACCAATAGTAGTACAGCTGAACCAA 6671
TCTGTAGAAAATTAATTTGTACAGACCCCAACAATTCAGAAAAGTATCCGTATCCAGAGAGGACCCAGGGAGA 6746
GCATTTGTATCAATAGCAAAAATAGGAAATATGAGACAAGCACATTTGTAACATTAGTAGAGCAAAAATGGAATAAC 6821
ACTTTAAAACAGATAGATAGCAAAATTAAGAGACAATTTGGAAATAATAAAAACAATAATCTTTAAGCAGTCTCA 6896
GGAGGGGACCCAGAAAATGTAAACCCACAGTTTAAATTTGTGGAGGGGAATTTTCTACTGTAAATCAACACAACCTG 6971
TTTAATAGTACTTGGTTTAAATAGTACTTGGAGTACTAAAGGTCAAATTAACCTGAGGGAAGTACACCAATCACC 7046
CTCCATGCAGAAATAAAACAATTTATAAATCATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCCCTCCATCAGT 7121
GGACAAATTAGATGTTTCATCAATATTACAGGGCTGCTATTAAACAAGAGATGGTGGTAAATAGCAACAATGAGTCC 7196
GAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGATATGAGGGACAATTTGGAGAAGTGAATTTATATAAATATAAAGTAGTAAAA 7271
ATTGAACCATTAGGAGTAGCAOCCACCAAGGCAAGAGAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAGAGCAGTGGGAATA 7346
GGAGCTTTGTCTCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGCAAGCATTATGGGGCCAGGTCAATGAOCTGAGCGGTACAG 7421
GCCAGACAATTATTTGCTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGGCCACAGCATCTG 7496
TTGCCACTCAGACTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAAATCTGGCTGTGGAAAGATAOCTAAAGGATCAA 7571
CAGCTCTGGGATTTGGGTTGCTCTGGAAAACCTCAATTTGCAOCCACTGCTGTGCCCTTGAATGCTAGTTGGAGT 7646
AATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGAOCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC 7721
TTAATACACTOCTTAATTAAGAAATCGCAAAACAGCAAGAAAAGAAATGAACAAGAAATTTGGAATTAGATAAA 7796
TGGCCAGTTTGTGCAATTTGGTTTAAACATAACAAATTTGGCTGTGGTATATAAAAATTAATTCATAATGATAGTAGGA 7871
GGCTTTGGTAGGTTTAAAGAAATGTTTGTGCTGACTTTCTGTAGTGAATAGAGTTAGCCAGGGATATTCAOCCATTA 7946
TCGTTTCAGACCCACTCCCAATCCGAGGGGACCCGACAGGCCCCGAAAGAAATAGAAGAAGAGGTGGAGAGAGA 8021
GACAGAGACAGATCCATTTGATTTAGTGAOCCGATCTTAGCACTTATCTGGGAGATCTGGGAGCCCTGTGCCCTC 8096
TTCAGCTAOCACCCCTTGCAGAGACTTACTCTTGATTTGTAAGAGGATTTGTGGAACCTCTGGAGCCAGGGGGTGG 8171
CAAGCCCTCAAAATTTGGTGGAAATCTCTACAGTATTTGGAGTCAGGAGCTAAAGAAATAGTGTCTGTAGCTTTGCTC 8246
AATGCCACAGCTATAGCAGTAGCTGAGGGGACAGATAGGGTTATAGAAGTAGTACAAGGAGCTTATAGAGCTATTT 8321
CGCCACATACCTAGAAGAATAAGACAGGGCTTTGGAAAGGATTTTCTCTATAAGATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAG 8396
TAGTGTGGTTGGATGGCTGCTGTAAAGGGAAGAAATGAGACAGAGCTGAGCCAGCCAGATGGGGTGGGACAGC 8471
ATCTGAGACCTACAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAACACAGCAGCTAACAAATGCTGATTTGTGCCCTGGCT 8546
AGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGTGGGTTTTCAGTCCACACTCAGGTAOCTTTAAGACCAATCACTTACAAAGCC 8621
AGCTGTA

のうち、

- ヌクレオチド5323から8052である図2AのEcoRI-BamHI DNA断片、
- ヌクレオチド5323から8474である図2AのEcoRI-XhoI DNA断片、
- ヌクレオチド5323から8592である図2AのEcoRI-KpnI DNA断片、
- ヌクレオチド5323から8628である図2AのEcoRI-BglIII DNA断片、

10

20

30

40

50

ヌクレオチド5924から8052である図2AのKpnI-BamHI DNA断片、
 ヌクレオチド5924から8474である図2AのKpnI-XhoI DNA断片、
 ヌクレオチド5924から8592である図2AのKpnI-KpnI DNA断片、
 ヌクレオチド5924から8628である図2AのKpnI-BglIII DNA断片、
 ヌクレオチド6618から8052である図2AのBglIII-BamHI DNA断片、
 ヌクレオチド6618から8474である図2AのBglIII-XhoI DNA断片、
 ヌクレオチド6618から8592である図2AのBglIII-KpnI DNA断片、
 ヌクレオチド6618から8628である図2AのBglIII-BglIII DNA断片、
 ヌクレオチド7198から8052である図2AのBglIII-BamHI DNA断片、
 ヌクレオチド7198から8474である図2AのBglIII-XhoI DNA断片、
 ヌクレオチド7198から8592である図2AのBglIII-KpnI DNA断片、及び
 ヌクレオチド7198から8628である図2AのBglIII-BglIII DNA断片
 からなる群から選択されるHTLV-IIIのDNA断片によりコードされる、後天性免疫不全症
 候群の患者の血清またはHTLV-IIIに対する抗体を含む血清に免疫反応性である、単離され
 た組換えHTLV-III env/env-lorポリペプチド。

【請求項2】

HTLV-IIIのgag DNA由来であり、且つ、図3～図14の塩基配列中の
 【化2】

| | | |
|---|------|--|
| GACCTC | 39 | |
| TCTGGCTAACTAGGGAOCCACTGCTTAAGCCTCAA | 75 | |
| TAAAGCTTGCCFTGAGTGCCTCAAGTAGTGTGTCGCGGCTCTGTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGA | 150 | |
| CCCTTTTATGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGGCGCCGAAACAGGGACCTGAAAGCGAAGGGGAAAACA | 221 | |
| GAGCTCTCTCGAAGCAGGACTGGCTTCTGTAAGGGCCACGGCAAGAGGGCGGGCGGCGACTGGTGTAGTACG | 296 | |
| CCAAAAATTTTACTAGCCGAGGCTAGAAAGGAGAGATGGGTGGAGAGGGTCAGTATTAAAGGGGGGAGAATTT | 371 | |
| AGATGATGGGAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAACAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAG | 446 | |
| CAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCTGGCTGTGTAGAATCATCAGAGGGCTGTAGACAAATCTGGGACA | 521 | |
| GCTACAAOCCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACOCTCTATTGIGT | 596 | |
| GCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAGTAAGAA | 671 | |
| AAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTCAGACAGGACACAGCAGTCAGGCCAAAATTAOCCATATAGTGCAGAACAT | 746 | |
| CCAGGGGCAAAATGGTACATCAGGCATATCAOCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGC | 821 | |
| TTTCAGGCCAGAGTAATAOCCATGTTTTCAGCATTTATCAGAAGGAGGCCAOCACAAAGATTTTAAACACCATGCT | 896 | |
| AAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGOCATGCAAAATGTTAAAAGAGACCATCAATCAGGAAGCTGCAGAAATGGGA | 971 | |
| TGAGTACATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCAOCCAGGOCAGATGAGAGAOCAGGGGAAAGTGACATAGCAGG | 1046 | |
| AACACTAGTACCCCTCAGGAACAANTAGGATGGATGACAAATAATCCOCTATCCAGTAGGAGAAATTTATAA | 1121 | |
| AAGATGGATAATCTCGGATTAATAAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAACAGCATTTCTGGACATAAGACAAGG | 1196 | |
| ACCAAAAGAACCTTTTATAGACTATGTAGAACCGGTTCTATAAAACTCTAAGAGCCAGCAAGCTTTCACAGGAGGT | 1271 | |
| AAAAATTTGGATGACAGAAAACCTTGTGTGGTCCAAAATGCCAACCCAGATTGTAAAGACTATTTTAAAAGCATTTGGG | 1346 | |
| ACCAGGGCTTACACTAGAAAGAAATGATGACAGCATGTCCAGGAGTAGGAGGACCCGGOCATAAGGCAAGAGTTTT | 1421 | |
| GGCTGAAGCAATGAGCCAAAGTAACAAATACAGCTACCATTAATGATGCAAGAGGCCAATTTTATAGCAACCAAGAAA | 1496 | |
| GATGGTTAAGTGTTCATTTGTGGCAAAGGAGGCACAGCCAGAAATTCAGGGCCOCCATAGCAAAAAGGGCTG | 1571 | |
| TTGGAAATGTGAAAGGAAGGACCAAAATGAAGATTTGTACTGACAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAA | 1646 | |

のうち、

ヌクレオチド34から1550である図2AのSstI-ApaI DNA断片、
 ヌクレオチド34から1640である図2AのSstI-BglIII DNA断片、
 ヌクレオチド959から1550である図2AのPstI-ApaI DNA断片、及び
 ヌクレオチド959から1640である図2AのPstI-BglIII DNA断片
 からなる群から選択されるHTLV-IIIのDNA断片によりコードされる、後天性免疫不全症
 候群の患者の血清またはHTLV-IIIに対する抗体を含む血清に免疫反応性である、単離され
 た組換えHTLV-III gagポリペプチド。

【請求項3】

HTLV-IIIのpol DNA由来であり、且つ、図3～図14の塩基配列中の

【化3】

| | | |
|--|---------------|------|
| | TGATCAGATACTC | 2021 |
| ATAGAAATCTGIGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATAGTAGGACCTACAOCTGTCAACATAAATGGAAGAAAT | | 2096 |
| CTGTGACTCAGATTGGTGGCACTTTAAAATTTTCCATTAGCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAGCOA | | 2171 |
| GGATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAGAAAAATAAAGCAATTAGTAGAATTTGTACA | | 2246 |
| GAAATGGAAAAGGAAGGAAAATTTCAAAAATTTGGGCTGAGAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAG | | 2321 |
| AAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATTAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAA | | 2396 |
| GTTCATTTAGGAATACCAATCCCGCAGCGTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCA | | 2471 |
| TATTTTTCAGTCCCTTAGATGAAGCFTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATAOCTAGTATAAACAATGAGACA | | 2546 |
| CCAGGGATTAGATAATCAGTACAAATGTGCTTCCACAGGGATGAAAAGGATCAOCCAGCAATATTOCAAAGTAGCATG | | 2621 |
| ACAAAATCTTAGAGCCTTTAAAAACAATAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTA | | 2696 |
| GGATCTGACTTAGAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAGCTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGACTT | | 2771 |
| ACCACCCAGACAAAAACATCAGAAAGAAOCTCCATTCCTTTGGATGGGTATGAAGTCCATCCGTGATAAATGG | | 2846 |
| ACAGTACAGCCCTATAGTCTGCAGAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTGGGAAATTC | | 2921 |
| AATTTGGCAAGTACAGATTTAOCAGGGATTAAGTAAGGCAATTTATGTAACCTCCTTAGAGGAOCCAAAGCACTA | | 2996 |
| ACAGAAGTAATACCACTAACAGAAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGAGATTTCAAAAAGAACAGTA | | 3071 |
| CATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATACGAAGCAGGGCCAAAGGCCAATGGACATAT | | 3146 |
| CAATTTTATCAAGGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGSAAAATATGCAAGAAATGAGGGGTGCCACACTAATGAT | | 3221 |
| GTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAACCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAGACTOCTAAATTT | | 3296 |
| AACTAACCATACAAAAGGAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTTGGCAAGCCOCTGGATTCCTGAGTGG | | 3371 |
| GAGTTTGTATAAOCCTCCTTTAGTGAATTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCATAGTAGGAGCAGAAAC | | 3446 |
| TTCTATGTAGATGGGGCAGCTAACAGGGAGACTAAATTTAGGAAAAGCAGGATATGTTACTAACAAGGAAGACAA | | 3521 |
| AAGGTGTGCCCTAACCAACAACAATTCAGAAAATCAGTTACAGCAATTTATCTAGCTTTGCAGGATTC | | 3596 |
| GGATTAGAAAGTAAACATAGTAAACAGACTCAAAATATGCATTTAGCAATCATTCAGCACAAOCCAGATAAAGTGAA | | 3671 |
| TCAGAGTTAGTCAATCAATTAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAGGTCATCTGGCATGGGTACCAGCAC | | 3746 |
| AAAGGAATTTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTTAGTCACTGCTGCAATCAGGAAAATACTATTTTATAGTGA | | 3821 |
| ATAGATAAGGCCAAGATGAACATGAGAAATATCACAGTAATTTGGAGAGCAATGGCTAGTGTATTTAAOCTGOCA | | 3896 |
| OCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGOCCGCTGTGATAAATGTTCAGCTAAAAGGAGAAGCCATGCAITGGACAAGTA | | 3971 |
| GACTGTAGTCCAGGAATATGGCAACTAGATTTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCCCTGGTAGCAGTTTATGTA | | 4046 |
| GCCAGTGGATATAAGAGCAGAGTTATTCAGCAGAAACAGGGCAGGAAACAGCATATTTTCMTTTAAAATTA | | 4121 |
| GCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAATACATACAGACAATGGCAGCAATTTCAOCCAGTCTAOGGTTAAGGCCGCC | | 4196 |
| TGTTGGTGGGGGGAATCAAGCAGGAATTTGG | | |

のうち、30

ヌクレオチド2009から3406である図2AのBclI-KpnI DNA断片、
 ナクレオチド2009から4228である図2AのBclI-EcoRI DNA断片、
 ナクレオチド2009から3734である図2AのBclI-KpnI DNA断片、
 ナクレオチド3406から4228である図2AのKpnI-EcoRI DNA断片、及び
 ナクレオチド3734から4228である図2AのKpnI-EcoRI DNA断片
 からなる群から選択されるHTLV-IIIのDNA断片によりコードされる、後天性免疫不全症
 候群の患者の血清またはHTLV-IIIに対する抗体を含む血清に免疫反応性である、単離され
 た組換えHTLV-III polポリペプチド。

【請求項4】40

図3～図14の塩基配列中のヌクレオチド番号5780から8370

【化4】

GAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAATATCAGCAGCTTGTGGAGATGGGGTGG 5846
 AGATGGGGCAOCATGCTCCTTGGGATGTGATGATCTGTAGTCTACAGAAAAATTTGGGTCACAGTCTATAT 5921
 GGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAOCCOCCACTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCATATGATACAGGGTA 5996
 CATAAATGTTTGGGCCACACATGCTGTGTACOCACAGACOOCAOCCACAAGAGTAGTATTGGTAAATGTGACA 6071
 GAAAATTTTAAACATGTGGAAAAATGACATGGTAGAACAGATGCAATGAGGATATAATCAGTPTATGGGATCAAAGC 6146
 CTAAAGCCATGTGTAAATTAOCCOCCACTCTGTGTAGTITAAAGTGCACCTGATTTGAAGAATGATACTAATACC 6221
 AATAGTAGTAGOCCGGAATGATAATGAGAAAGGAGAGATAAAAACTGCTCTTTCAATATCAGCACAAGCATA 6296
 AGAGGTAAGGTGCAGAAAGAAATATGCATTTTATAAACTTGTATATAAATACCAATAGATAATGATACTAOCAGC 6371
 TATACGTTGACAAGTTGTAAACCTCAGTCAATACACAGGCTGTCCAAAGGTATCCTTTGAGCCAATTCOCATA 6446
 CATTTATGTGCOOCCGCTGGTTTGTGGATCTAAATGTAATAATAAGAGCTCAATGGAACAGGAOCCATGTACA 6521
 AATGTCAGCACAGTACAATGTACACATGGAATTAGGCCAGTAGTATCAACTCAACTGCTGTAAATGGCAGTCTG 6596
 GCAGAAGAAGAGGTAGTAATTAGATCTGCCAATTTACACAGACAATGCTAAAACATAATAGTACAGCTGAOCAA 6671
 TCTGTAGAATTAATGTACAGACCCACAACAATACAAGAAAAAGTATCCGTATCCAGAGGGAOCCAGGGAGA 6746
 GCATTTGTTACAATAGAAAAATAGAAATATGAGACAAGCACATTTGTAACATTAGTACAGCAAAATGGAATAAC 6821
 ACTTTAAAACAGTAGATAGCAAAATTAAGAGAACATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAGTCTCA 6896
 GGAGGGGACCCGAAATGTAAOCCACAGTPTTAAATGTGGAGGGGAATTTTCTACTGTAAATTAACACAACCTG 6971
 TTTAATAGTACTTGGTPTAATAGTACTTGGAGTACTAAAGGCTCAAATAACACTGAAGGAAGTACACAATCAC 7046
 CTOCCATGCAGATAAAACAATTTATAAATCATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCOOCTOCCATCAGT 7121
 GGACAAATFAGATGTTCATCAATATFACAGGGCTGCTATTTACAAGAGATGGTGGTAAATAGCAACAATGAGTCC 7196
 GAGTCTTCAGACCTGGAGGAGGATATGAGGACAATTTGGAGAAGTGAATTTATAAATATAAAGTAGTAAAA 7271
 ATTGAOCCATTAGGAGTAGCAOCCOCCAGGCAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATA 7346
 GGAGCTTTGTCTCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCAGTATGGGGCAGGGTCAATGAOCCGCTGACGGTACAG 7421
 GCCAGACAATTTATGTCTGTATATGTCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATFAGGGGCAACAGCATCTG 7496
 TTGGCAACTCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCTGGCTGTGGAAGATAOCTAAAGGATCAA 7571
 CAGCTOCTGGGATTTGGGTTCTCTCGGAAAACCTCATTTGCCOCCACTGCTGTGCOCTTGGAAATGCTAGTTGGAGT 7646
 AATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATFACACAAGC 7721
 TTAAATACACTOCTTAATTTGAAGATOGCAAAOCCAGCAAGAAAAAGATGAACAAGATTTATTTGGAATFAGATAAA 7796
 TGGGCAAGTTTGTGGAATTTGGTTAAACATBACAATTTGGCTGTGGTATATAAAATTTATTCATAATGATAGTAGGA 7871
 GCTTTGGTAGGTTTAAAGATAGTTTTGCTGTACTTTCTGTAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTA 7946
 TGGTTACAGACCCACTOCCAAATCOOAGGGGAOCCGACAGGCOOAGGAATAGAAGAAGAGGTGGAGAGAGA 8021
 GACAGAGACAGATCCATTCATTTAGTGAOCCGATCTTAGCACATATCTGGGAGGATCTGGGAGOCTGTGCOCTC 8096
 TTCAGCTAOCACCCCTTGGAGACTTACCTCTGATTTGTAACAGGATTTGTGGAACCTCTGGGACCCAGGGGCTG 8171
 GAGCOOCTCAAATTTGGTGGAAATCTOCTACAGTATTTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTGTAGCTTCTC 8246
 AATGOCACAGCTATAGCAGTAGCTGAGGGACAGATAGGGTTATAGAAGTAGTACAAGGAGCTTATAGAGCTATT 8321
 OCCCACATAOCTAGAAGAATAAGACAGGGCTTGGAAAGGATTTTGTCTAT

10

20

30

にわたるHTLV-IIIのenv/env-lorのオープンリーディングフレームのDNAの単離されたDNA断片によりコードされ、且つ、後天性免疫不全症候群の患者の血清またはHTLV-IIIに対する抗体を含む血清に免疫反応性である、単離された組換えHTLV-III env/env-lorポリペプチド。

【請求項5】

図3～図14の塩基配列中のヌクレオチド番号730から1629

【化5】

| | |
|--|------|
| OCTATAGTGCAGAACAT | 746 |
| CCAGGGGCAAAATGGTACATCAGGOCATATCACTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTGAAGAGAGGC | 821 |
| TTTCAGOOCCAGAGTAAATACCATGTTTTCAGCAATATCAGAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCT | 896 |
| AAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAATGGCA | 971 |
| TAGAGTACATCCAGTGCATGCAGGGOCATTTGCAOCAGGOCAGATGAGAGAOCAGGGGAAGTGCATAGCAGG | 1046 |
| AACTACTAGTACCCCTCAGGAACAATAGGATGGATGACAAATAATCACTATCCAGTAGGAGAAATTTATAA | 1121 |
| AAGATGGATAATCCTGGGATTAATAAAATAGTAAGAAATGATAGOOCTACAGCATTCCTGGACATAAGACAAGG | 1196 |
| AOCAAAAGAACCTTTTAGAGACTATGTAGAACGGTTCATATAAACTCTAAGAGCCAGCAAGCTTCACAGGAGGT | 1271 |
| AAAAAATTTGGATGACAGAAACCTTGTGTGGTCCAAAATGCGAAOCCAGATTTGTAAGACTATTTTAAAAGCATTTGG | 1346 |
| ACCAGGGCTACACTAGAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTAGGAGGACCCGGCCATAGGCAAGATTTT | 1421 |
| GGCTGAAGCAATGAGCCAGTAACAAATACAGCTACCATTAATGATGACAGAGGCAATTTTAGGAAOCCAAAGAAA | 1496 |
| GATGGTTAAGTGTTCATTTGTGGCAAGAGGGCACACAGCCAGAAATTTCCAGGGCCOCTTAGGAAAAGGGCTG | 1571 |
| TTGCCAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGATTTGACTGAGAGACAGGCTAAT | |

10

にわたる gag p24ポリペプチドをコードする HTLV-III の gag のオープンリーディングフレームの DNA の単離された DNA 断片によりコードされ、且つ、後天性免疫不全症候群の患者の血清または HTLV-III に対する抗体を含む血清に免疫反応性である、単離された組換え HTLV-III gag ポリペプチド。

【請求項6】

図3～図14の塩基配列中のヌクレオチド番号1630から4673

【化6】

```

TTTTTAGGGAAGATCTG 1646
GGCTTCTACAGGGAAGGCGAGGGAATTTCTTCAGAGCGAGCCAGAGGCAACAGGCCCCACTTTCTTCAGAG 1721
CAGAGCCAGAGGCAACAGGCCCCAGAGAGAGAGCTTCAGGCTCGGGTATAGAGCAACAACCTCCCCCTCAGAGCA 1796
GGAGCGGATAGACAAGGAACTGTATCTTTAACTTCCCTCAGATCCTCTTTGGCAAGGACCCCTCGTCAACAATA 1871
AAGATAGGGGGCAACTAAAGGAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATCAGTTTG 1946
CCAGGAAGATGCAAAACAAAAATGATAGGGGGAATTCGAGGTTTATCAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTC 2021
ATAGAAATCTGTGGCAATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTCGAAGAAAT 2096
CTGTACTCAGATTGGTTCAGCTTTAAATTTTCCCATTAGCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAGGCA 2171
GGAATGGATGGCCAAAAGCTTAAACAATGGCCATTGACAGAGAAAATAAAGCCATTAGTAGAAATTTGTACAG 2246
GAAATGCAAAAGGAAAGGCAAAATTTCAAAAATTCGGGCTGAGAAATCCATACAACTACAGTATTTGCCATAAAG 2321
AAAAAGCAGTACTAAATGGGAAATAATAGTAGTTTCAGAGAACTTAAATAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAA 2396
GTCAATTAGGAATAACACATCCCGAGGGTTAAAAAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCA 2471
TATTTTTAGTTCCTTAGATGAAGACTTCAGGAGTATCTGCTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGACA 2546
CCAGGATTAGATTCAGTACAGTGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCAACAGCAATTTCCAAAGTAGCATG 2621
ACAAAAATCTTAGAGGCTTTTAAAAACAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATAATGATGATTTGTATGTA 2696
GGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCTTAGAACAATAAGGAGGCTGAGACAACATCTGTTGAGTGGGGACTT 2771
AOCACACCAGCAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCCTGATAAATGG 2846
ACAGTACAGGCTATAGTCTGCGCAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAGTTAGTGGGCAATTTG 2921
AATTTGGGCAAGTACAGTTTACCCAGGGTTAAAGTAAAGCAATTTATGTAACCTCCTAGAGCAACCAAGCACTA 2996
ACAGAAATAAOCACATACAGAAAGCAGAGCTAGAACTGCCAGAAAACAGAGGATTTCAAAAAGAACAGTA 3071
CATGGAGTGTATTTATGCCCATCAAAAAGCTTANTAGCAGAAATACAGAACCCGGGCAAGGCAATGGACATAT 3146
CAATTTTATCAAGAGGCAATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAATATGCAAGAAATGAGGGTGGCCACACTAATGAT 3221
GTAAAACAAATACAGAGGCAAGTCAAAAATAAACCACAGAAAGCATAGTAAATAGGGGAAAGCACTCCATAATTT 3296
AAACTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAACATGGTGGACAGATTTGGCAAGCCACTGGATTCCTGAGTGG 3371
GAGTTGTATAAATCCCTCCCTTAGTCAAATTTGGTACAGTTAGAGAAAGAAOCCATAGTAGGAGCAGAAACC 3446
TTCTATGTAGTGGGGCAGCTAACAGGGAGACTAAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTTACTAACAAAGGACACAA 3521
AAGGTTGTCOCCCTAACACACAAACATCAGAAAACCTGAGTTACAAGCAATTTATCTAGCTTTGCAGGATTC 3596
GGATTAGAGTAACATAGTAAACAGACTCACAATATGCAATAGGAATCAITCAAGCAACCCAGTAAAAGTGAA 3671
TCAGAGTTAGTCAATCAAAATATAGAGCAGTTAATAAAAAGGAAAGGTTCTATCTGGGCTGGGTAOCAGCAC 3746
AAAGGAATTTGGAGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTCAAGTCTGGAATCAGGAAAATACTATTTTATAGATGA 3821
ATAGATAAGGCAAGATGAACATGAGAAATATCAGAGTAATTTGGAGCAATTTGGCTAGTATTTTAAOCTGCA 3896
OCTGTAGTAGCAAAAAGAAATAGTACAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAGCCATGCAATGGACAAGTA 3971
GACTGTAGTCCAGGAATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAGGAAAAGTTATCCCTGGTAGCAGTTCAATGTA 4046
GCCAGTGGATATATAGAGCAGAGTTATTTCCAGCAAAACAGGGCAGGAAACAGCATAATTTCTTTTAAAATTA 4121
GCAGGAAGTGGCCAGTAAAACAAATACATACAGCAATGGCAGCAATTTCCAGCTGCTACGGTTAAGGCOGOC 4196
TGTGTGGTGGGGGAATCAAGCAGAAATTTGGAATTOCTACAAATCCCAAAGTCAAGGAGTAGTAGAATCTATG 4271
AATAAAGAAATTAAGAAATTAAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCA 4346
GTATTCATCCAAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTTGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAATAGTAGACATAATA 4421
GCAACAGACATACAACTAAAGAAATTAACAAAACAAATTAACAAAATTCAAAATTTTCGGTTTATACAGGGAC 4496
AGCAGAAATCCACTTTGAAAGGACAGCAAGGCTOCTCTGAAAGGTGAAGGGGCTAGTANTACAGATAAAT 4571
ACTGACATAAAGTAGTGCACAAAGAAAAGCAAGATCATTAGGGATTTGCAAAAACAGTTGGCAGGTGATGAT 4646
TGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGAT

```

10

20

30

にわたるHTLV-IIIのpolのオープンリーディングフレームのDNAの単離されたDNA断片によりコードされ、且つ、後天性免疫不全症候群の患者の血清またはHTLV-IIIに対する抗体を含む血清に免疫反応性である、単離された組換えHTLV-III polポリペプチド。

40

【請求項7】

HTLV-III DNA断片を含む組換えベクターで形質転換された細胞により発現される、請求項1乃至6の何れか1項に記載のポリペプチド。

【請求項8】

組換えベクターがOmpAまたはpMR100である、請求項7に記載のポリペプチド。

【請求項9】

- ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として生産される、請求項8記載のポリペプチド。

【請求項10】

以下の工程：

(a) 固相に固定した請求項1乃至9の何れか1項に記載の単離されたHTLV-IIIポリペプ

50

チドを含む免疫吸着剤を、単離された体液と接触させることにより、体液中のHTLV-IIIポリペプチドに対する抗体を固定化HTLV-IIIポリペプチドと結合させ；

(b) 体液から該免疫吸着剤を分離し；

(c) 該免疫吸着剤を標識HTLV-IIIポリペプチドまたはヒト免疫グロブリンに対する標識抗体と接触させ；そして

(d) HTLV-IIIに対する抗体の存在の指標として、免疫吸着剤に結合した工程(c)の標識ポリペプチドまたは標識抗体の存在を検出すること；

からなる、単離されたHTLV-IIIポリペプチドに対する体液中の抗体を検出する方法。

【請求項11】

請求項1乃至9の何れか1項に記載の単離されたHTLV-IIIポリペプチドを試料と接触させ；そして、前記ポリペプチドと結合した抗体の存在を検出する工程からなる、HTLV-IIIに対する抗体を検出するための免疫アッセイ。 10

【請求項12】

請求項1乃至9の何れか1項に記載の単離されたHTLV-IIIポリペプチドを含む、診断試薬。

【請求項13】

ポリペプチドが標識されている、請求項12に記載の診断試薬。

【請求項14】

ポリペプチドが固定化されている固相をさらに含む、請求項12に記載の診断試薬。

【請求項15】

請求項1乃至9の何れか1項に記載の単離されたHTLV-IIIポリペプチドと特異的に反応する固相固定化抗体、および該HTLV-IIIポリペプチドと特異的に反応する標識可溶性抗体を含む、アッセイキット。 20

【請求項16】

(i) 固相に固定化した請求項1乃至9の何れか1項に記載の単離されたHTLV-IIIポリペプチドを含む、免疫吸着剤、および

(ii) 標識HTLV-IIIポリペプチドまたはヒト免疫グロブリンに対する標識抗体を含む、体液中のHTLV-IIIに対する抗体の存在を測定するためのアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

30

【0001】

本発明は分子生物学およびウイルス学の分野、特にヒトT細胞白血病ウイルス - III型 (HTLV - III) に関する。

【従来の技術】

【0002】

ヒトT細胞白血病 - リンパ腫ウイルス (HTLV) という用語は、T細胞トロピックレトロウイルスの特定の属を意味する。これらのウイルスはある種のT細胞新生物の発生において重要な役割を演ずる。現在、3つの型のHTLVが知られている。この属の1つの亜属であるHTLV - I型 (HTLV - I) は、日本、カリブ海沿岸およびアフリカのあ 40
る地域に発生する成人T細胞白血病 - リンパ腫 (ATLL) の原因と関係がある。HTLV - II型 (HTLV - II) は毛状細胞白血病のT細胞変異型をもつ患者から単離された。M. ポポビク (Popovic) らの「エイズおよびエイズ患者からの細胞変性レトロウイルス (HTLV - III) の検出、単離および連続生産」、サイエンス, 224: 497 - 500 (1984) を参照されたい。

【0003】

HTLV - III型 (HTLV - III) は後天性免疫不全症候群 (AIDS, エイズ) にかかった多数の患者から単離された。HTLV - IIIはエイズ患者から単離されたプロトタイプのウイルスである。このエイズに対して最も危険な立場にあると報告された人々には、同性愛または両性愛の男性、静脈内薬物使用者および米国のハイチ人移民が含まれる。提供者から集めた血液製剤を受容する血友病患者および頻繁に輸血を受ける人々 50

も危険な立場にある。エイズの臨床上的症状は、一般にヘルパーTリンパ球の減少をともなう今だ解明されていない恐ろしい免疫不全を包含する。これらは悪性腫瘍および感染症をともなうことがある。エイズ患者の死亡率は高い。あまり恐ろしくない型のエイズも存在し、これはリンパ腫および低下したヘルパーT細胞数をともなうことがあるが、成熟したエイズの破壊的症状を示さない。これらの徴候を呈する初期エイズ(プレエイズ)患者も多数存在する。これらの人々のなかで誰が一層恐ろしい症状へ進行するかを予言することは今のところ不可能である。

【0004】

伝染性エイズの病因としてHTLV-IIIが含まれることは多くのことから証明されている。第一に、首尾一貫した疫学が存在し、すなわちエイズ患者の95%以上がHTLV-IIIに対して特異的な抗体を有する。第二に、この病気において再現できるウイルスの同定および単離がなされ、HTLV-IIIの100種以上の変異型がエイズ患者から単離された。第三に、エイズに感染した血液提供者から輸血を受けた正常な健康人がエイズに感染する。

10

【0005】

HTLV-IIIはHTLV-IおよびHTLV-IIといくつかの特性を共有するが、形態学的、生物学的および抗原的に区別し得ることがわかった。R.C.ガロ(Gallo)らの「危険な状態にあるエイズ患者からの細胞変性レトロウイルスの検出および単離」、サイエンス、224:500-503(1984)を参照されたい。例えば、HTLV-IおよびHTLV-IIのコアタンパク質p24およびp19、ならびにエンベロープ抗原に対する抗体との交差反応性を証明するか、あるいはクローニングしたHTLV-IおよびHTLV-IIのDNAとの核酸交差ハイブリダイゼーション実験を行うことにより、HTLV-IIIがHTLV-IおよびHTLV-IIと抗原的に関係のあることがわかった。しかしながら、HTLV-IおよびHTLV-IIと異なって、HTLV-IIIは正常人の臍帯血液および骨髄からのT細胞にインビトロで感染しかつそれを形質転換する能力を欠いており、感染細胞に対してのみ細胞変性作用を有していた。

20

【0006】

他のレトロウイルスのRNAゲノムと同様に、HTLV-IIIのRNAゲノムはウイルスタンパク質をコードする3つの遺伝子を含んでいる：すなわち1)内部構造(ヌcleoカプシドまたはコア)タンパク質をコードするgag遺伝子；2)RNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)をコードするpol遺伝子；および3)ウイルス粒子のエンベロープ糖タンパク質をコードするenv遺伝子。さらに、HTLV-IIIゲノムはenv遺伝子と3'側LTRとの間に位置するPxと呼ばれる領域を含んでおり、これはウイルスの機能的死亡と関連があるように思われる。

30

【0007】

現在のところ、エイズの症状が現われる以前にエイズを診断することはまだ困難である。この病気の予防に利用できる方法も目下のところ存在しない。一般にエイズ患者の治療は成功せず、そしてHTLV-IIIが身体に及ぼす破壊的作用に多数の犠牲者が出ている。

【発明が解決しようとする問題点】

40

【0008】

本発明は、免疫反応性HTLV-IIIポリペプチドを発現できる組換え体/ベクター宿主系内でのHTLV-III DNAのクローニングに基づいている。免疫反応性ポリペプチドを発現する系内でのHTLV-III DNAのクローニングに基づいて、本出願人はエイズの診断、治療および予防に有用な方法を開発した。本出願人は体液(例えば血液、唾液、精液)中のHTLV-IIIおよびその抗体を検出する方法、ならびに免疫療法(例えばエイズの予防接種や受動免疫)において有用な方法を開発した。さらに、本出願人は体液中のHTLV-IIIの検出に有用なHTLV-III DNAプローブおよびRNAプローブの作製方法を開発した。

【0009】

50

HTLV-IIIゲノムのセグメントによってコードされるポリペプチドは、これらの組換えDNA法を使って生産した。例えば、HTLV-IIIゲノムの3つの領域（env遺伝子配列、env-lor遺伝子配列、およびHTLV-III cDNAからの1.1KbのEcoRI制限断片）によってコードされるポリペプチドを生産した。発現されたポリペプチドは単離した。これらのポリペプチドはエイズ患者の血清およびHTLV-IIIに対する抗体と免疫反応性であり、従ってHTLV-IIIに対する抗体の有無について血液およびその他の体液をスクリーニングするのに有用である。それ故、本発明はエイズの診断方法ばかりでなく、HTLV-IIIを含む血液または血液成分を通じて他の人々へのこの病気が伝染するのを予防する方法をも提供するものである。特に後者は、血液成分（例えば血友病の治療のための第VIII因子；第IX因子）を得るために提供された血液を輸血または使用するに先立って、その血液をスクリーニングするのに価値がある。

10

【0010】

組換えDNA法によって生産されたポリペプチドは、このウイルスに対する抗体（モノクローナル抗体を含む）の生産に利用できる。この種の抗体は血液、唾液、精液などの体液中のHTLV-IIIを直接検出するためのイムノアッセイおよび診断技術の基礎をなすものである。このウイルスに対する中和抗体は、この病気に対して受動免疫を与えるのに使用できる。

【0011】

このような組換え体/ベクター宿主系内でのHTLV-III DNAのクローニングは、さらにHTLV-III DNAのヌクレオチド塩基配列を決定するための基礎を提供する。DNAプローブはHTLV-IIIゲノムに特異的なDNA領域と相同であり、これらのDNAプローブは血液、唾液または他の体液中のHTLV-IIIを検出する別の方法を提供する。HTLV-IIIゲノムに特異的な領域を含むRNAプローブも作製され、体液中のHTLV-IIIの検出に使用される。

20

【問題点を解決するための手段】

【0012】

HTLV-IIIとHTLV-ウシ白血病ウイルス（BLV）属の他のウイルスとの間の類似性にもかかわらず、HTLV-IIIの生物学および病理学は実質的に異なっている。例えば、比較的乏しい相同がHTLV-Iまたは-IIゲノムのそれと比較したときHTLV-IIIゲノムに見られた。HTLV-IIIによる感染はしばしば強い免疫抑制（エイズ）をもたらし、その結果OKT4（+）細胞集団の減少をきたす。この作用はインビトロでのリンパ球培養において、OKT4（+）細胞へのHTLV-III感染の、形質転換作用というよりむしろ、著しい細胞変性作用によって反映される。これとは対照的に、HTLV-Iによる感染はT細胞白血病-リンパ腫（OKT4（+）細胞の悪性化）の低い発生率をもたらす。HTLV-I患者の場合もある程度の免疫不全を示す。HTLV-Iおよび-IIによる一次リンパ球培養物の感染は、主にOKT4（+）細胞のインビトロ形質転換を引き起こす。リンパ球へのHTLV-I感染の細胞変性作用は明らかに起こるが、HTLV-IIIの場合に観察されるものほど顕著な細胞変性作用ではない。

30

40

【0013】

HTLV-IIIはさらにインビボおよびインビトロでの伝染性ウイルス粒子生産の程度においてもHTLV-Iおよび-IIと異なっている。細胞不含の高力価伝染性ウイルス粒子はエイズ患者の精液および唾液、ならびにHTLV-IIIを感染させた培養物の上清から得ることができる。成人T細胞白血病-リンパ腫（ATLL）患者またはHTLV-Iもしくは-IIを感染させた培養物からは、もし存在するとしても、きわめて少数の細胞不含伝染性ウイルス粒子を回収できるにすぎない。

【0014】

エンベロープ糖タンパク質はエイズ患者の抗血清によって認識される主な抗原である。この点で、HTLVは他のレトロウイルスと類似しており、そのためにエンベロープ糖タ

50

ンパク質は一般に最も抗原的なウイルスポリペプチドである。さらに、中和抗体は一般にレトロウイルスのエンベロープ糖タンパク質に対して向けられる。エイズ患者からの血清試料の88~100%はHTLV-IIIの抗原と反応する抗体を含むことが見出され、主な免疫反応はHTLV-IIIの推定上のエンベロープ抗原であるp41に対して向けられた。コアタンパク質に対する抗体もエイズ患者の血清に見出されたが、エンベロープ抗原に対する抗体の存在ほど感染指示剤として有効であるとは思われない。

【0015】

HTLV-IIIのp41抗原は、ウイルスエンベロープがウイルスの不活化および精製過程で部分的に破壊されるので、その性状決定が難しかった。本発明はHTLV-IIIウイルスの抗原成分の性状を決定しかついくつかの方法で他のウイルス抗原成分の存在および特性を決定するという大いなる要求に答えるものである。それはHTLV-IIIポリペプチド、そのポリペプチドに対する抗体、RNAプローブおよびDNAプローブのような産物を提供し、またそれらの生産方法も提供する。これらはスクリーニング、診断および治療を行う際に役立つ。

10

【0016】

本発明は、HTLV-IIIタンパク質をコードする組換えDNA塩基配列の翻訳によって生産されるHTLV-IIIポリペプチドに関する。この方法で生産され、エイズ患者からの血清またはHTLV-IIIに対する抗体と免疫反応性のポリペプチドは、組換えDNA-生産による免疫反応性HTLV-IIIポリペプチドと称される。これらにはHTLV-IIIコアタンパク質およびエンベロープ糖タンパク質をそれぞれコードするgagおよびenvDNA配列に特異的な組換えDNA配列の翻訳によって生産される抗原HTLV-IIIコアポリペプチドおよびエンベロープポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。それらはまたHTLV-III cDNAの1.1KbのEcoRI制限断片に含まれる組換えDNA配列の翻訳、およびHTLV-IIIのsor遺伝子およびPx遺伝子に特異的な組換えDNA配列の翻訳によって生産されるポリペプチドをも包含する。sorDNA配列は複製感応HTLV-IIIウイルスに共通している。Px遺伝子はHTLV-IIIゲノムのenv遺伝子と3'末端との間に位置し、1つの大きな読み取り枠を有するコーディング配列(1or)を含む。envDNA配列と1orDNA配列とは共にHTLV-IIIゲノムの同じ読み取り枠内に位置するため、この遺伝子領域はenv-1orと称される。

20

30

【0017】

HTLV-IIIのこれらの領域によりコードされるポリペプチドは、HTLV-III感染およびHTLV-IIIに対する抗体を検出する免疫化学検定法において使用することができる。これらの方法はエイズを診断する際に役立つ。さらに、これらは血液成分(例えば血友病の治療のためのV因子)の輸血または生産のために血液を使用するのに先立って、その血液をスクリーニングする際にも利用できる。スクリーニング技術の利用可能性はエイズ伝染の危険を減ずるであろう。

【0018】

ポリペプチドと反応する抗体の検出は多くの確立された方法によって実施できる。例えば、免疫反応性HTLV-IIIポリペプチドをポリスチレンビーズや他の固体支持体のような固相に付着させる。次にその固相をHTLV-IIIに対する抗体について試験しようとする血液試料とインキュベートする。適当なインキュベーション期間の経過後固相と血液試料とを分離する。固相に結合した抗体は、標識ポリペプチドまたはヒト免疫グロブリンに対する標識抗体を用いて検出できる。

40

【0019】

HTLV-IIIポリペプチドはエイズのワクチン予防にも使用される。このウイルスに対する予防接種のためには中和抗体を誘導する免疫原性ポリペプチドが利用されるであろう。その第一の候補はウイルスエンベロープポリペプチドである。

【0020】

これらのポリペプチドはHTLV-IIIポリペプチドに対する抗体(モノクローナル

50

抗体を含む)の生産にも使用できる。これらの抗体は体液(血液, 唾液, 精液など)中のウイルスを直接検出する免疫化学検定法において使用される。特異的HTLV-III抗原決定基に対するモノクローナル抗体を使用する検定法は、偽陽性の結果を減少させることによってウイルス検定の正確さを改善するであろう。また、ウイルスに対する抗体は免疫療法にも利用でき、例えばウイルスに対する受動免疫を与えることができる。

【0021】

ポリペプチドの生産方法、ならびにこれらのポリペプチドに基づく診断方法も本発明の主題である。

【0022】

さらに、本発明は免疫反応性ポリペプチドをコードするHTLV-IIIの遺伝子の単離方法; これらの遺伝子のヌクレオチド塩基配列の同定方法; ウイルスRNAを生産させるべく適当なベクター内へのウイルスDNAに特異的なDNA配列の導入方法、およびDNAプローブの作製方法を提供する。これらのプローブはHTLV-III DNAに特異的な塩基配列で構成され、例えば血液のような体液中の相補的HTLV-III DNA配列を検定するのに有用である。HTLV-IIIポリペプチド

免疫反応性HTLV-IIIポリペプチドをコードするHTLV-III DNAのセグメントを単離するために、遺伝子操作法が使用される。これらのポリペプチドはエイズ患者からの血清またはHTLV-IIIに対する抗体と免疫反応性であり、これらにはコアタンパク質、HTLV-III DNAの1.1Kb EcoRI制限断片によりコードされる15Kdのペプチド、およびエンベロープ糖タンパク質が含まれる。これらの方法はまたポリペプチドをコードする断片の塩基配列決定にも使用できる。宿主細胞DNA内に組み込まれたプロウイルス遺伝子は分子的にクローニングされ、そしてクローニングされたプロウイルスのヌクレオチド塩基配列を決定する。

【0023】

HTLV-III DNAの大腸菌発現ライブラリーを作製する。HTLV-IIIゲノムをクローニングし、その後制限酵素を用いてクローニングしたHTLV-IIIゲノムを切断し、それによりDNA断片を得る。(図1および図2を参照されたい。)約200~500bpのHTLV-III DNA断片をアガロースゲルから単離し、T₄ポリメラーゼで末端修復し、そしてリンカーDNAに連結させる。リンカー連結DNAを次に制限酵素で処理し、アガロースゲルから精製して発現ベクター内でクローニングする。使用する発現ベクターの例はompA, pIN(A, BおよびC)、ラムダpL, T7, lac, Trp, ORFおよびラムダgt11である。さらに、pSV28pt, pSV2neo, pSVdhfrおよびVPVベクターのような哺乳動物細胞、ならびにGALIおよびGAL10のよう酵母ベクターも使用できる。

【0024】

細菌ベクターはlacコーディング配列を含み、この中に -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を生成させるためにHTLV-III DNAを挿入する。次に、この組換えベクターを細菌(例えば大腸菌)内に導入する(HTLV-III DNAを含むベクターを取り込んだこれらの細胞は形質転換されたと言われる)。その後、融合タンパク質を発現する形質転換細胞を同定するために、これらの細胞をスクリーニングする。例えば、細菌をマッコンキー(MacConkey)寒天平板に置いてクローンの表現型を確かめる。もし -ガラクトシダーゼが生産されているならば、コロニーが赤く見えるだろう。

【0025】

また、細菌コロニーはHTLV-III DNAプローブを用いてスクリーニングすることにより、興味あるDNA領域(例えば、HTLV-III gag, polおよびenv DNA配列)を含むクローンを同定できる。DNAプローブを用いたスクリーニングにおいて陽性であり、かつマッコンキー寒天平板において陽性であるクローンを単離する。

【0026】

HTLV-III DNA配列を含む細胞の同定は、HTLV-III特異的抗体と免

10

20

30

40

50

疫反応性であるHTLV-IIIポリペプチドの生産を可能にする。選択されたコロニーからの細胞は、ハイブリッドタンパク質を発現させる条件下に培養して増殖させる。その後、当分野で知られた方法により細胞タンパク質を得る。例えば、培養物を遠心分離し、得られた細胞沈殿物を破壊する。宿主細胞によって分泌されたポリペプチドを細胞培養物の上清から（細胞を破壊することなく）得ることもできる。

【0027】

全細胞タンパク質はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことにより分析する。他のタンパク質を全く含まないゲル上の一箇所融合タンパク質を同定する。また、ウェスタンブロット分析が陽性のクローンに対して行われる。このような分析はエイズ患者からの血清を用いて行われ、その結果HTLV-III特異的抗体と交差反応するHTLV-III-
-ガラクトシダーゼ融合タンパク質（抗原）を発現するクローンを同定することが可能になる。

10

【0028】

HTLV-III DNAを含むラムダ₁₀クローンはウイルスの複製型からクローニングされる。レトロウイルスが複製するとき、二重鎖DNAが生産される。クローニングされたHTLV-III DNAは制限酵素SstIで消化する。（図1.a参照）HTLV-III DNAのLTR内に2つのSstI認識部位が存在するので、ラムダ₁₀ベクターから取り出されたクローン化DNA配列には一方のLTR領域が存在しない。その結果、HTLV-III DNAの小さな（約200bp）断片が欠失する。

【0029】

得られたDNAを線状化し、env遺伝子領域を含む線状ゲノムDNAを制限酵素で消化していくつかの断片を得る。例えば、図1.bに示すようにKpnIまたはEcoRIプラスHindIIIを使って断片をつくる。得られた2.3Kb KpnI-KpnI断片；1.0Kb EcoRI-EcoRI断片；および2.4Kb EcoRI-HindIII断片はゲル電気泳動および電気溶出により単離する。これらの断片をランダムにせん断してさらに小さい断片をつくる。こうして得られた断片はアガロースゲルから分離し、そして約200~500bpのDNA断片を溶出する。

20

【0030】

溶出された200~500bp DNA断片は大腸菌T₄ポリメラーゼの使用により末端修復し、そして平滑末端を読み取り枠発現（ORF）ベクター（例えばpMR100）に連結させる。この連結はpMR100ベクターのSmaI部位で起こり、pMR100ベクターは2つのプロモーター領域、ラムダCI遺伝子のハイブリッドコーディング配列およびlacI-lacZ遺伝子融合配列を含む。このベクターにおいて、これらは読み取り枠の塩基配列からはずれており、その結果このベクターは非生産性である。HTLV-III DNAをこのベクターに挿入することにより、正しいDNA断片が読み取り枠を修正し、その結果CI-HTLV-III-
-ガラクトシダーゼ融合タンパク質が生産されるだろう。このハイブリッドの発現はlacプロモーターの制御下にある。pMR100の塩基配列に基づくと、SmaI部位にクローニングされたDNA断片挿入物がラムダCI遺伝子断片とlac-Z断片との間に適当な読み取り枠を生ずる場合、その挿入DNAはラムダCI遺伝子の枠により定められる読み取り枠に停止コドンを含むべきでないと考えられる。

30

40

【0031】

次いで、組換えpMR100ベクターを大腸菌の中に導入する。細菌はマッコンキー寒天平板上に置いてクローンの表現型を確かめる。-ガラクトシダーゼが生産されている場合は、コロニーが赤く見えるだろう。また、DNA挿入物を含むクローンを同定するために、HTLV-III DNAプローブを用いてコロニーをスクリーニングする。DNAプローブを用いてスクリーニングしたとき陽性でありかつマッコンキー寒天平板上で陽性であるクローンを単離する。

【0032】

選択されたコロニーからの細胞を培養して増殖させる。この培養物は遠心分離にかけ、

50

そして細胞沈殿物を破壊する。全細胞タンパク質はSDSポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行って分析する。融合タンパク質は他のタンパク質を全く含まないゲルの上の一箇所と同定される。(図15参照)

ウエスタンブロット分析もスクリーニングしたとき陽性であったクローンに対して行われる。エイズ患者からの血清が使用され、こうしてHTLV-III特異的抗体と交差反応するHTLV-III-βガラクトシダーゼ融合タンパク質を発現するクローンを同定することが可能になる。この方法によって1000個のクローンがスクリーニングされ、そして6個のクローンが陽性であった。

【0033】

pMR100クローニングベクターの性質ゆえに、生産性DNA挿入物は大きな融合ポリペプチドの一部として発現されるべきである。HTLV-III env遺伝子を含む組換えクローンは、コロニーハイブリダイゼーションによって同定した。βガラクトシダーゼ活性を有する大きな融合ポリペプチドの生産は、マッコンキー寒天平板上での表現型同定、βガラクトシダーゼ酵素検定および75% SDS-ポリアクリルアミドゲルの分析によって確かめた。この大きな融合タンパク質とHTLV-IIIに対する抗体との免疫反応は、エイズ患者からの血清を用いるウエスタンブロット分析によって評価した。また、大きな融合タンパク質は抗βガラクトシダーゼおよび抗CI抗血清とも反応した。この発見はそれらがCI-HTLV-III-lacZのタンパク質であるという仮説と一致する。

【0034】

HTLV-IIIの読み取り枠挿入物断片は、さらにDNA塩基配列決定によって分析する。pMR100のSmaIクローニング部位の両側にある2つのBamHI部位のうち一方はクローニング段階で破壊されるので、陽性クローンはHindIIIおよびClaI制限酵素で消化して挿入HTLV-III DNA断片を遊離させる。融合組換え体からHTLV-III ORF挿入物を単離し、そしてHindIIIおよびAccIで消化したM13クローニングベクターmp18およびmp19内でクローニングする。その後、陽性クローンのDNA塩基配列を決定する。

【0035】

約200~500bpのHTLV-III DNA断片をアガロースゲルから単離し、T₄ポリメラーゼで末端修復し、そしてEcoRIリンカーへ連結させる。次にEcoRIリンカーへ連結させたDNAをEcoRIで処理し、1%アガロースゲルから精製して発現ベクターラムダgt11内でクローニングする。このベクターはlacZ遺伝子コーディング配列を含み、このベクター内にβガラクトシダーゼ融合タンパク質を生成させるべく外来性DNAを挿入することができる。ハイブリッド遺伝子の発現はlacリプレッサーの制御下にある。lacリプレッサー遺伝子lacIは宿主細胞の大腸菌Y1090内の別のプラスミドpMC9によって運ばれる。1.5×10⁴の組換えファージを含むHTLV-IIIゲノムDNAのラムダgt11ライブラリーを調べるためにエイズ患者の血液を使用した。5000の組換え体のスクリーニングにおいて、強力なシグナルを発する100の独立クローンを単離した。陽性の組換えDNAクローンはさらにそれらの特定の遺伝子発現について明らかにされた。gag遺伝子特異的クローンを同定するために、P24に対するウサギ高度免疫血清を使用した。特定のHTLV-III遺伝子(詳細にはgag遺伝子, env遺伝子およびP_x遺伝子)のニックトランスレーションされたDNAプローブは、陽性の免疫反応性クローンを特定の遺伝子領域にグループ分けするのに使用した。

【0036】

エイズ血清によって強力なシグナルを発しかつHTLV-IIIのgag, pol, sorおよびenv-lor遺伝子領域を有する挿入物DNAを含む組換えクローンは、制限酵素によるマッピングおよびDNA塩基配列決定によって詳細に調べた。

HTLV-III DNAのヌクレオチド配列決定

HTLV-III DNAのヌクレオチド配列決定には遺伝子操作法を使用した。この

10

20

30

40

50

配列決定に使用することができる1つの技術は、ショットガン/ランダム配列決定法である。HTLV-III DNAを約300~500bpの大きさの断片にランダムにせん断する。これらの断片は例えばM13を使ってクローニングし、次いでコロニーはHTLV-III DNA断片挿入物を含むものを同定するためにスクリーニングする。その後塩基配列に重複部分が生ずるような多数の分析を行って、そのヌクレオチド配列を決定する。HTLV-III DNAの両鎖の塩基配列を決定してその向きを定める。制限酵素マッピングを用いて得られた塩基配列決定データを調べる。

【0037】

1つのクローニングされたHTLV-IIIゲノム(BH10)のヌクレオチド配列を図3~図14に示す。ここにはgagタンパク質p17およびgag p24のN末端およびgag p15のC末端(これはpolタンパク質のN末端と重なり合う)をコードする塩基配列位置が示されている。また、pol, sorおよびenv-lorの読み取り枠(ORF)も示される。クローンBH10(Rの一部, U5, tRNAプライマー結合部位およびリーダー配列の一部を含む)に存在しないHTLV-III DNAの残りの182塩基対の配列はクローンHXB2から誘導された。別の2つのクローン(BH8およびBH5)の塩基配列も示される。制限酵素部位はヌクレオチド配列の上に示し、クローンBH8に存在するがクローンBH10に存在しない部位はカッコ内に示す。ヌクレオチド251, 254, 5671および6987-7001に決失が見られる(〔 〕)。ヌクレオチドの位置(各線の右側)は転写開始部位からスタートしている。アミノ酸残基は4つの最も大きな読み取り枠に対して番号が付けられており(各線の右側)、各々の場合先行する終止コドンの後からスタートするが、gagの場合は最初のメチオニンコドンから数えている。提案されたペプチド切断部位(V)および起こりうるアスパラギン-結合グリコシル化部位(*)をenv-lor読み取り枠に対して示す。図3~図14の最初に示したクローンBH8およびBH10から誘導されるLTRの塩基配列は各クローンの3部分から誘導され、これらのウイルスゲノムの組み込まれたコピーの5'-LTRに存在するものと同であると推定される。

【0038】

クローンHXB2はラムダJ1内でクローニングされたHTLV-III感染H9細胞からのXbaI消化DNAの組換えファージライブラリーから誘導された。H9細胞はエイズ患者の血液から得られたHTLV-IIIのプールによって感染させたヒト白血球細胞である(F. Wong-Staal)のネイチャー, 312, 1984年11月を参照されたい)。クローニングベクタークローンBH10, BH8およびBH5はランダムgtWes. ラムダB内でクローニングされたHTLV-III感染H9細胞のHirt上清分画からのSstI消化DNAのライブラリーより誘導された。両方のライブラリーはプライマーとしてオリゴdTを使ってウイルス粒子RNAから合成されたcDNAプローブを用いてスクリーニングした。クローンBH8, BH5およびHXB2の一部はマクサム-ギルバード法(A. M. MaxamおよびGilbert, Methods in Enzymology, 65: 499-560 (1980))を参照)によって塩基配列を決定した。クローンBH10はプライマーとしてM13挿入物の塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチドを使用しかつポリメラーゼとしてDNAポリメラーゼIのクレノウ(Klenow)断片または逆転写酵素を使用することにより変更したサンガー(Sanger)の方法によって塩基配列を決定した。

HTLV-IIIに特異的なRNA, RNAプローブおよびDNAプローブの作製

HTLV-IIIからの全遺伝子または遺伝子セグメントであるDNA配列をT7ベクターのようなベクターに挿入する。この具体例は、ベクターがT細胞遺伝子10プロモーターからのTceupロモーターおよびT細胞遺伝子10タンパク質からの11個のアミノ酸をコードするDNA配列を含む。

【0039】

次に、このベクターを用いて大腸菌のような細胞を形質転換する。T7ベクターはT7ポリメラーゼを利用する。T7ポリメラーゼはRNA形成を触媒し、RNAポリメラーゼが

転写開始のために結合する部位であるT7プロモーターのみを認識する。このT7ポリメラーゼは大腸菌プロモーターを認識しない。その結果、HTLV-II DNA配列をT7ベクターのプロモーターおよびポリメラーゼ遺伝子の後に挿入し、かつターミネーターをHTLV-II DNA配列の直後に配置する場合、T7ベクターはHTLV-II DNA挿入物に相補的なRNAを直接製造するであろう。

【0040】

また、HTLV-II DNAのヌクレオチド配列の決定は、DNAプローブを作るための基礎を提供する。RNAプローブとDNAプローブは共に、体液中のHTLV-IIの検出に利用できるようにHTLV-IIゲノムの特定領域を含まねばならない。HTLV-IIゲノムとHTLV-Iおよび-IIゲノムとの間の相同は比較的少なく、プローブはHTLV-IIに独特の領域(すなわちHTLV-Iまたは-IIと共有しない領域)を含む。例えば、HTLV-IIのenv遺伝子領域のヌクレオチド配列が使用される。

10

【0041】

ウイルスRNAまたはDNAは、非常に高い濃度のウイルスを含むことが知られている。例えば唾液中のHTLV-IIを検出するのに用いられる。これは、例えば唾液試料を変性し、これを濾紙に移し、どちらかの型のプローブを用いてスクリーニングするドットプロット(dot blot)の手段によって行うことができる。試験体液として唾液を使用する場合、HTLV-IIの検出は血液を試験する場合よりも迅速かつ容易であると考えられる。

20

HTLV-IIポリペプチドと反応するモノクローナル抗体の生産

HTLV-IIポリペプチドと反応するモノクローナル抗体は、抗体産生細胞株によって生産される。抗体産生細胞株は普通ハイブリドーマとして知られるハイブリッド細胞株でありうる。このハイブリッド細胞は、HTLV-IIポリペプチドに対する抗体を生産する細胞と、不滅性細胞(すなわちハイブリッド細胞に組織培養の長期安定性を付与する細胞)との融合によって作られる。ハイブリッド細胞株を作る場合、その第一の融合パートナー(抗体産生細胞)はHTLV-IIポリペプチドに対して免疫化した動物の脾臓細胞でありうる。これとは別に、抗体産生細胞はHTLV-II抗原に対する抗体を産生するところの単離されたBリンパ球でありうる。このリンパ球は脾臓、末梢血液、リンパ節またはその組織から得ることができる。第二の融合パートナー(不滅細胞)はリンパ芽細胞または形質細胞腫細胞(例えば、それ自身抗体産生能を有する悪性の骨髄腫細胞)でありうる。

30

【0042】

HTLV-IIポリペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するネズミハイブリドーマは、マウス骨髄腫細胞とポリペプチドに対して免疫化したマウスからの脾臓細胞との融合によって作られる。マウスを免疫化するために、種々の異なる免疫感作方法を行うことができる。例えば、マウスは精製ポリペプチドの一次および二次免疫感作を受ける。融合は標準方法において行われる。コーラー(Kohler)およびミルスタイン(Milstein)のネイチャー(ロンドン)256, 495-497(1975); R. ケネット(Kennet)のモノクローナル抗体(ケネットら編集, 365-367頁, プレナム・プレス, ニューヨーク, 1980年)を参照されたい。

40

【0043】

次いで、ハイブリドーマをポリペプチドと反応する抗体の産生についてスクリーニングする。これは当分野で知られたスクリーニング方法により行われる。

【0044】

抗体産生細胞株を作る別の方法は、抗体産生細胞の形質転換による。例えば、HTLV-IIポリペプチドに対して免疫化した動物から得られたBリンパ球を、ヒトBリンパ球の場合にはエプスタイン-バールウイルス(Epstein-Barr virus)のようなウイルスを感染させて形質転換し、それにより不滅性抗体産生細胞を得る。例えば、コズボー(Kozbor)およびロドー(Rodor)のImmunology T

50

oday 4(3), 72-79(1983)を参照されたい。これとは別に、形質転換遺伝子または形質転換遺伝子産物を用いてBリンパ球を形質転換してもよい。

【0045】

HTLV-IIIポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、抗体産生ハイブリドーマをマウスの腹腔内に注入し、適当な時間の経過後非常に高力価の均一抗体を含む腹水を採取し、そして腹水からモノクローナル抗体を単離することにより大量に生産することができる。異種ハイブリドーマは照射マウスまたは胸腺欠損ヌードマウスに注入すべきである。また、HTLV-IIIポリペプチドを生産する細胞をインビトロで培養し、その細胞培養基から分泌されたモノクローナル抗体を単離する方法によっても抗体を得ることができる。これらの方法により産生された抗体は診断検定法（例えば体液中のHTLV-IIIを検出する）および受動免疫療法において使用できる。HTLV-IIIポリペプチドと反応する抗体は、エイズまたは体液（例えば血液、精液、唾液）中のHTLV-IIIの存在を検出するための診断試験、ならびに受動免疫療法のための基礎を提供する。例えば、抗p41を生産し、慣用技術によりこれを固相に付着させ、そして試験すべき体液を固定化抗体と接触させることが可能である。このようにして、体液中のHTLV-III（抗原）を検出することができ、この方法はHTLV-IIIに対する抗体を検出する試験よりもはるかに少ない偽陽性の試験結果をもたらすだろう。

10

【0046】

本発明はさらに次の実施例により説明されるであろう。

20

実施例 1

超音波処理されたDNA断片の作製

ゲルにより精製したHTLV-III制限酵素断片10 μ gを超音波処理して、平均500bpの大きさに断片化した。超音波処理後、容量を減らすためにDNAを0.1 \times TBE中のDEAE-セルロースカラムに通した。DEAE結合DNAは0.2M NaCl-TE(2M NaCl, 10mm トリス-HCl pH7.5, 1mM EDTA)5mlで洗い、次に1M NaCl-TEで溶出してエタノール沈殿させた。超音波処理したDNAの大きさを1.2%アガロースゲルにより測定した。所望の長さ(200~500bp)のDNA断片をゲルから溶出した。T4DNAポリメラーゼを使って、超音波処理法によって生じた一本鎖DNA末端を修復および/または切り取った。DNA断片をT4ポリメラーゼと共にヌクレオチドを添加することなく37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートして3'末端からヌクレオチドを除き、次に4種のヌクレオチド前駆体を最終濃度が100 μ Mとなるように加え、この反応混合物をさらに30分インキュベートして5'末端の一本鎖のつき出た部分を修復した。68 $^{\circ}$ Cで10分間酵素を熱不活化することによりこの反応を停止させた。DNAは1度フェノール抽出し、エタノール沈殿させ、そしてTE中に再懸濁した。

30

実施例 2

ランダムにせん断したDNA断片のクローニング

超音波処理しかつ平滑末端に修復したHTLV-III DNA断片を、ORF発現ベクターpMR100のSmaI部位に連結し、そして標準形質転換法を使って宿主細胞LG90を形質転換した。形質転換細胞の λ -ガラクトシダーゼ陽性表現型は、その形質転換細胞をアンピシリン(25 μ g/ml)含有マッコンキー寒天平板上に採置して、表現型を37 $^{\circ}$ Cで20時間後に評価することによって同定した。

40

実施例 3

ハイブリッドタンパク質分析

アンピシリン(25 μ g/ml)含有Lブイオン中で一晚増殖させた飽和培養物からの細胞10ml試料を遠心分離し、細胞沈殿物を1.2倍に濃縮したレムリ(Laemmli)サンプル緩衝液500 μ lに再懸濁した。細胞は渦巻混合し、100 $^{\circ}$ Cで3分間沸騰させることにより再懸濁した。次に、この溶菌液を22ゲージ針を使って繰り返しせん断し、溶菌液の粘度を低下させた。タンパク質試料約10 μ lは7.5% SDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミド)ゲルによる電気泳動処理を行った。

50

【0047】

タウビン (Towbin) らの方法に従って、SDS-PAGEゲルからニトロセルロース紙へタンパク質を移行させた。移行後、このフィルターを0.1%消泡剤Aおよび0.0001%メルチオレート (merthiolate) を含有するPBS中の5% (w/v) 脱脂牛乳の溶液中で37において2時間インキュベートし、それにより全ての利用しうるタンパク質結合部位を飽和させた。エイズ抗血清との反応は、大腸菌溶菌液をあらかじめ吸収させた1%エイズ患者抗血清含有の上記牛乳緩衝液中で行った。この反応は回転攪拌機上の密閉プラスチック袋中で4において18~24時間実施した。このインキュベーション後、0.5%デオキシコール酸、0.1M NaCl、0.5%トリトンX-100、10mm磷酸塩緩衝液pH7.5および0.1mM PMSFを含有する溶液で室温において20分づつ3回フィルターを洗浄した。

10

【0048】

抗原-抗体反応を視覚化するために、¹²⁵Iでヨウ素化した第二のヤギ抗ヒト抗体とニトロセルロースとをインキュベートした。ヨウ素化抗体との反応は、第一の抗体のときに使用したのと同じ牛乳緩衝液中室温で30分間実施した。その後先に述べたようにしてニトロセルロースを洗浄し、コダックXAR5フィルムおよび増感スクリーンを使って-70で感光した。

実施例4

コロニーハイブリダイゼーションによるHTLV-II DNAライブラリーのスクリーニング

20

大腸菌LG90形質転換体は意図するDNA領域 (例えばHTLV-II gag, envまたはPx遺伝子の特定配列) を含むHTLV-II DNAプローブを用いてスクリーニングした。ニトロセルロースフィルター上でコロニーを増殖させ、ハイブリダイゼーションプローブとしてニックトランスレーションされたHTLV-II DNAを使い、グルンスタイン (Grunstein) およびホグネス (Hognes) の方法に従ってスクリーニングした。

【0049】

一般には、制限エンドヌクレアーゼ消化によってDNA断片を切り取り、これをゲル精製し、そしてニックトランスレーションにより 0.5×10^8 cpm/ μ gの比活性に³²Pで標識した。〔P.W.J.リグビー (Rigby) らの J. Mol. Biol., 113, 237 (1977) を参照〕DNAが固定されたニトロセルロースフィルターは $6 \times$ SSC (0.9M NaCl/0.09Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、 $5 \times$ デンハート溶液 (Denhardt's solution: ポリビニルピロリドン、フィコルおよびウシ血清アルブミン各々0.02%)、 10μ g/mlの変性した超音波処理大腸菌DNAを用いて55で3~5時間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、変性ハイブリダイゼーションプローブを加えた同じ溶液の新しい試料中にこのフィルターを入れた。ハイブリダイゼーションは68で16時間行った。その後フィルターを55において $0.3 \times$ SSCで繰り返し洗浄し、X線フィルムを使用して感光した。

30

実施例5

エイズ患者からの血清と免疫反応するHTLV-IIの組換えDNAによって生産されたペプチド

40

発現ベクターとしてpIN-II-ompA (ompA) を使用した。ompAはリポタンパク質 (大腸菌中で最も豊富なタンパク質) 遺伝子プロモーター (lpp) およびlacUV5プロモーター-オペレーターを有する (図16参照)。ompAベクターはさらにlacリプレッサーをコードするDNAセグメントを含み、これは挿入DNAの発現をIPTGのようなlacオペロン誘導物質により調節させる。ompAクロニングベクターは3つの読み取り枠の全てに3つの特異な制限酵素部位EcoRI、HindIIIおよびBamHIを含み、そしてこれらの制限酵素部位のいずれかにDNAが挿入される。

【0050】

50

ベクターラムダgtWESラムダBのSstI部位に9Kbの長いHTLV-IIIDNA挿入物を含む組換えクローンのラムダBH10から、種々の制限断片を切り取った。次に、これらの制限断片を3つの読み取り枠の全てでompAベクターに挿入し、そして大腸菌JA221細胞を形質転換するのに使用した。形質転換細胞は、ニックトランスレーションされたHTLV-IIIDNAプローブを使用するin situコロニーハイブリダイゼーションにより、HTLV-IIIDNAについてスクリーニングした。陽性クローンはHTLV-IIIIに特異的な抗体を使用してHTLV-IIII抗原ペプチドの発現についてスクリーニングした。このために、HTLV-IIII DNA組換えプラスミドを含む大腸菌細胞の溶菌液を12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動にかけ、そしてニトロセルロースフィルター上へ移行した。その後、このフィルターを最初にエイズ患者からの十分な性状決定された血清とインキュベートし、次に¹²⁵Iで標識したヤギ抗ヒトIgG抗体とインキュベートした。洗浄したフィルターをオートラジオグラフィにかけ、抗HTLV-IIII抗体と反応性のペプチドを同定した。

10

【0051】

抗HTLV-IIII抗体と免疫反応性であるペプチドをコードするいくつかの遺伝子セグメントが見出された。これらのうちの1つに1.1KbのEcoRI制限断片がある。この断片は3つの読み取り枠の全てでompAベクター内に挿入した(図16参照)。細胞は100mg/mlのアンピシリンを含むLブイオン中37°CでOD₆₀₀ = 0.2へと増殖させた。この時点で細胞培養物を2つのアリコートに分割した。一方のアリコートに最終濃度が2mMとなるようにIPTGを加えた(誘導)。他方のアリコートにはIPTGを加えなかった(非誘導)。IPTG誘導の際に、3つのプラスミド構成物(OmpA₁-R-6(O1R6), OmpA₂-R-7(O2R7)およびOmpA₃-R-3(O3R3)と命名される)の全ての形質転換細胞は、エイズ患者の血清中の抗HTLV-IIII抗体と強く反応する15Kdのペプチドを生産した(図17参照、レーン1は精製したHTLV-IIIIウイルス粒子; レーン2および3は非誘導および誘導のO1R6; レーン4および5は非誘導および誘導のO2R7; レーン6および7は非誘導および誘導のO3R3である)。この反応性は正常人から採取した血清を用いた場合検出されない。

20

【0052】

HTLV-IIIIゲノムのDNA配列データは、EcoRI断片の5'末端に位置するpol遺伝子内に1つの読み取り枠が存在することを示す。3つの組換え構成物O1R6, O2R7およびO3R3のDNA塩基配列決定は、これらの組換え体の各々が各ベクターのコーディング配列に結合したHTLV-IIIIプラスミド鎖の異なる読み取り枠を有するという事実を証明した。O3R3の場合のみ、挿入DNAの読み取り枠がompAベクター内のシグナルペプチドによって定められるそれと一致するが、O1R6およびO2R7の場合pol遺伝子セグメントDNAの読み取り枠がベクターにより定められるそれと不一致である。(図18参照)

30

ヌクレオチド位置24-29には6bpのリボソーム結合部位AAGGAG(シャイン-ダルガルの配列、Shine-Dalgarno sequence)があり、これにより11bp下流(位置41-43)には開始コドンATGが存在する。3つの組換え体の全てによって合成される15Kdのペプチドは、この内部開始コドンを使用して転写物から翻訳されると考えられる。このことが真実である場合には、ペプチドは位置41-43に存在するATGから出発して、位置446-448に存在する停止コドンで終り、それによりHTLV-IIIIのpol遺伝子の3'末端セグメントによりコードされる135アミノ酸残基から成るペプチドが生産される。

40

【0053】

HTLV-IIII DNA pol遺伝子の読み取り枠がベクターにより定められるそれと一致するO3R3構成物は、15Kdペプチドの他に、19Kdと16.5Kdの大きさの2つの別のペプチドを生産した(図17参照)。19Kdペプチドはさらに35個のアミノ酸残基を含み、そのうちの21個はOmpA₃ベクターによってコードされるシグ

50

ナルペプチドからのものであり、残りの14個は挿入HTLV-III DNAそれ自体によってコードされると思われる。16.5Kdペプチドはプロセッシングを受けた19Kdペプチド(シグナルペプチドが開裂している)でありうる。

【0054】

O1R6およびO2R7構成物もエイズ患者の血清と弱く反応する約17.5Kdの別のペプチドを生産する(図17参照)。このペプチドの開始点は明らかでない。1.1KbのEcoRI断片は、ヌクレオチド位置360-965の間に延びるSOR(短い読み取り枠)と呼ばれる第二のコーディング領域を含む(図16参照)。この領域内の5つのAUGメチオニンコドンのうち4つがこの読み取り枠の5'末端の近くに存在する。このDNAセグメントは192, 185, 177または164個のアミノ酸残基から成るペプチドをコードできるだろう。しかしながら、この読み取り枠の5'末端にははっきりと認めうるリボソーム結合部位が存在しない。

10

【0055】

さらに、15Kdペプチドは実際にpol遺伝子から誘導されるという決定が多くの証拠により支持された。第一に、O1R6、O2R7およびO3R3(図16)からの1.1Kb EcoRI挿入物からの3'末端StuI/EcoRI断片の欠失は15Kdペプチドの合成に影響を与えない。第二に、5'末端EcoRI/NdeI断片のみを含むクローンがまだ同じ15Kdペプチドを生産する。最後に、読み取り枠クローニングベクターpMR100内に適切に挿入されたSORコーディング配列をもつ種々のDNA断片を含む組換えクローンは、エイズ患者の血清中に存在する抗HTLV-III抗体との免疫反応性が非常に乏しいラムダCI-HTLV-III-ガラクトシダーゼ3分節融合タンパク質を生産した。

20

【0056】

エイズ患者の血清中でウイルスpol遺伝子から誘導された15Kdペプチドに対する有意な免疫反応性を検出した。この免疫反応性ペプチドの特性は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるHTLV-IIIウイルス粒子抗原の結合パターンに関して、拮抗阻害免疫検定法を用いて決定した。精製HTLV-IIIウイルス粒子をSDSで処理し、電気泳動にかけ、そしてニトロセルロースフィルターの上に移した。破壊したHTLV-IIIウイルス粒子を含む同一のフィルター細片を、O1R6、O2R7または対照細菌クローンの溶菌液の存在下または不存在下に、十分に性状決定がなされたエイズ患者の血清とインキュベートした。エイズ患者の血清に含まれる抗HTLV-III抗体とフィルターにしみ込ませたウイルス粒子のタンパク質との間の特異的免疫反応は、^{1 2}₅Iで標識したヤギ抗ヒト抗体によって明らかにした。図19に示すように、O1R6の溶菌液はウイルスp31タンパク質とエイズ血清との免疫反応を阻害するが、対照細胞の溶菌液は阻害しない。この結果は、ウイルスpol遺伝子の3'末端によってコードされる組換え15Kdタンパク質が他のウイルス粒子タンパク質p31の一部であるということを示唆しており、p31がHTLV-IIIウイルス粒子と一緒に同時精製される細胞タンパク質であるというある人々によって共有された考え方と対照をなしている。

30

【0057】

15Kdペプチドに対する抗体がエイズ患者の血清中に広く含まれるかについても評価した。抗原の源としてO1R6の溶菌液を使用するウエスタンブロット分析において、エイズ患者と正常な人々からのコード化血清のパネルを試験した。20のエイズ血清の全てが15Kdペプチドと反応し、8の正常対照はどれも15Kdペプチドと反応しなかった。代表的な結果を図20に示す。これらのデータは、全部ではないにしても、大部分のエイズ患者がウイルスp31タンパク質に対する抗体を産生することを示している。

40

実施例 6

HTLV-IIIの読み取り枠遺伝子セグメントの大腸菌内での発現

HTLV-III DNAをラムダBH10から切り取った。このラムダBH10はベクターラムダgtWESラムダB内に挿入したHTLV-III DNAの9Kbセグメントを含む先に作製した組換えラムダファージである。このHTLV-III DNAを

50

超音波処理し、約0.5 KbのDNA断片をゲル電気泳動により精製し、末端修復し、そしてORFベクターpMR100のSmaI部位に挿入した(図21参照)。このベクターはハイブリッドコーディング配列〔バクテリオファージラムダのラムダCI遺伝子のN末端(5セグメント)がN末端欠失lacIZ遺伝子(3セグメント)に融合される〕を含む第二DNA断片に結合した細菌lacプロモーターDNAセグメントを含む。SmaIクロニング部位を含む短いリンカーDNA断片を、lacIZコーディングDNAの上流でフレームシフト変異が起こるような方法で、これらの2つの断片の間に挿入した。その結果、pMR100はlac⁻宿主大腸菌LG90の細胞内に導入したとき検出可能な β -ガラクトシダーゼ活性を示さない。SmaIクロニング部位に読み取り枠を含む外来性DNA(この場合はHTLV-III DNA)を挿入すると、その挿入コーディング配列がラムダCIリーダーおよびlacIZ遺伝子の双方に関して正しい読み取り枠内にある場合、フレームシフト変異を逆転させることができる。形質転換細胞はマックコンキー平板上でスクリーニングして、 β -ガラクトシダーゼ酵素活性をその場で発現する個々のクローンを検出した。

10

20

30

40

50

【0058】

スクリーニングされた6000のアンピシリン耐性形質転換細胞のうち、約300が β -ガラクトシダーゼ活性を発現するとわかった。³²Pで標識し、ニックトランスレーションされたHTLV-III DNAをプローブとして使用するコロニーハイブリダイゼーションは、これらlac⁺クローンの全てがHTLV-III DNAを含むことを明らかにした。lac⁺クローンにおいて、pMR100のSmaI部位に挿入されたHTLV-III断片はラムダCIリーダーセグメントによって定められる読み取り枠に停止コドンを含んではならず、またlacIZ遺伝子も正しい翻訳読み取り枠で存在しなければならない。3要素融合遺伝子は、N末端にラムダCIタンパク質の一部をもち、中間にHTLV-IIIセグメントをもち、そしてC末端にlacIZポリペプチドをもち3分節融合タンパク質として発現された。

【0059】

lac⁺クローンによって生産されたタンパク質は、ラムダCI- β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を生産する対照lac⁺クローンpMR200の溶菌液と共に7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル上でその溶菌液を分割することにより分析した。pMR200のlacIZ遺伝子は、pMR100のlacIZ遺伝子が活性 β -ガラクトシダーゼを生産するためにラムダCI遺伝子と同じ読み取り枠になるべく1個の塩基対を欠失している点を除いてpMR100のそれと同じである。 β -ガラクトシダーゼおよびその融合タンパク質の非常に大きな寸法に基づいて、それらはSDS-ポリアクリルアミドゲル上で溶菌液中の大部分のタンパク質から分離され、そして図22.Aに示すようにクーマシーブリリアントブルー染色によって簡単に同定することができる。HTLV-III DNAを含むlac⁺クローンのいくつかは、ラムダCI-lacIZ融合タンパク質よりも大きな(15000~27000ダルトン)ポリペプチドを生産する。これらの発見はDNA挿入物の長さが700bp以下であるというデータと一致する。 β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質は全細胞タンパク質の約1~2%を占めた。

【0060】

lac⁺クローンにより生産されたペプチドは、エイズ患者の血清との免疫反応についてウエスタンブロット分析により試験した。lac⁺クローンの溶菌液をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動処理した後、それらをニトロセルロースフィルターへ移行させた。これらのタンパク質ブロットを最初にエイズ患者の血清と反応させ、次に¹²⁵Iで標識したヤギ抗ヒトIgGと反応させた。図22.Bのオートラジオグラフは代表的な融合タンパク質とエイズ患者血清との免疫反応性を示す。組換えペプチドはこの他に β -ガラクトシダーゼ抗血清とも反応し、それらが一般構造式ラムダCI-HTLV-IIIペプチド-lacIZを有するという提案と一致した。HTLV-III DNA挿入物を含まない陰性対照のpMR100およびpMR200の免疫反応パターンから、この特別のエイズ血清は宿主大腸菌のいくつかの細菌タンパク質と反応する抗体を含むこと

が明白である。このことはエイズ患者が通常多数の細菌に感染していることからして驚くにあたらない。大腸菌抽出物を結合させたセファロース4Bを用いてエイズ患者の血清を吸着させると、バックグランド免疫反応がある程度減少するが、それは完全には消失しなかった。

【0061】

約300の独立したHTLV-III DNA含有Lac⁺コロニーは、クーマシーブルーリアントブルー染色およびウエスタンブロッティングを使用してSDS-ポリアクリルアミドゲルにより分析した。それらのうち約半数は長さが300~600bpのDNA挿入物に対応して、約100~200個のアミノ酸からなる付加的ペプチドを含む融合タンパク質を発現することがわかった。これらの融合タンパク質のうち20はエイズ患者からの血清と特異的に反応することが見出された。非反応性クローンは恐らく、抗体と反応しないような状態に折り重なったペプチドを含むか、あるいはエイズ患者の体内で免疫原性がないHTLV-IIIタンパク質分子の領域に相当するペプチドを含むであろう。Lac⁺クローンの残りの半数は、大きさがラムダCI-ガラクトシダーゼタンパク質と明らかに異なる融合タンパク質を発現した。このグループの融合タンパク質からはエイズ患者の血清と反応するものが全く見出せなかった。

10

【0062】

Lac⁺ORFクローンからのHTLV-III DNA挿入物は、サザンブロッティング法を使ってHTLV-IIIゲノムの特定セグメントへマッピングされた。これらの実験において、各プラスミドクローンはニックトランスレーションにより³²Pで標識し、そして一群のHTLV-III DNA制限断片とハイブリダイゼーションを行った。このハイブリダイゼーション分析は、DNA塩基配列決定データと一致するORF-A, ORF-B, ORF-CおよびORF-D(図2.A参照)と名づけた4つの読み取り枠セグメントへと全てのLac⁺ORFクローンをマッピングした。gagおよびpol遺伝子のコーディング領域に相当する読み取り枠ORF-Aおよび-Bは、それぞれ1.5Kbおよび3.0Kbの長さである。ORF-Cは約0.6Kbの長さであり、ORF-B領域とわずかに重なっており、そして21Kdのポリペプチドをコードすることができる。ORF-Cの位置およびpol遺伝子とそれとの重複部分は、HTLV-Iおよび-IIのenv遺伝子構造を暗示する。しかしながら、sor(short open reading frame, 短い読み取り枠)と命名したORF-Cは完全なエンベロプタンパク質をコードするにはあまりに短かすぎる。第四の読み取り枠のORF-Dはその長さが2.5Kbであり、主要エンベロプ糖タンパク質の大型前駆体と3'末端から誘導される別のタンパク質(HTLV-Iおよび-IIのlor産物に類似している)との両方をコードできるだろう。env-lorと命名したHTLV-IIIのこの遺伝子領域は、HTLV-IおよびHTLV-IIのlorの少なくとも2倍の長さであり、この領域に1つまたは2つ以上のタンパク質がコードされているかどうか現在のところはっきりしない。

20

30

【0063】

多数のクローンを分析するために、サザンブロッティングおよびDNA塩基配列決定の両方法を使用した。図2.Bに示すように、エイズ患者の血清と免疫反応する融合タンパク質を発現するLac⁺ORFクローンは、ORF-A(例えば#175および#191)、ORF-B(例えば#13, 31および162)またはORF-D(例えば#113, 121および127)の領域に位置し、sor領域には存在しなかった。これらの領域の全てのタンパク質が免疫反応性であるとは限らない(例えばORF-Dに位置するORFクローン#76)。

40

【0064】

HTLV-IIIの読み取り枠構造の分析は、どの読み取り枠がenv遺伝子に相当するかについての疑問を提起した。HTLV-IIIのenv-lor領域が推定されるlor遺伝子の他にenv遺伝子の全部または一部を含むと考えられる。最近になって、HTLV-Iのlor遺伝子はウイルス活性化および形質転換の過程に関連した42Kdタ

50

ンパク質をコードすることが示唆された。ORFクローンの1つ(図2・Bの#127)の溶菌液を、ウエスタンブロット法に基づくストリップラジオイムノアッセイで、20人のエイズ患者と12人の正常人からの血清に対して試験した場合、ラムダC I - H T L V - I I I - ガラクトシダーゼ融合タンパク質に対する免疫反応は19人のエイズ患者血清において検出され、正常対照からは全く検出されなかった。この結果は、ORFクローン#127に含まれるenv-lor領域の部分によりコードされるタンパク質がH T L V - I I I 感染細胞内で生産され、そしてエイズ患者の、全部ではないにしても、大部分に抗体を産生させるということを示している。

産業上の適用可能性

本発明は、体液中のH T L V - I I I D N Aの存在に関するスクリーニングおよびエイズの診断に利用される。

均等物

本明細書で述べた特定の物質および方法に均等の多数の物質および方法が、単に日常的な実験法を使用することにより当業者によって認識され、また確認されるであろう。このような均等物は本発明の範囲内であると考えられ、先の特許請求の範囲に包含される。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】図1はH T L V - I I I D N Aを表わす。図1・aはゲノムが制限酵素S s t Iによって切断される部位を示し、図1・bは制限酵素K p n , E c o R IおよびH i n d I I Iの作用により作られたH T L V - I I Iゲノムの断片を示す。

【図2】図2はH T L V - I I I D N Aを示す。図2・Aはゲノム内の制限酵素部位を示し、図2・Bは読み取り枠クローン内のD N A挿入物のH T L V - I I Iゲノム中での位置を示す。(+)および(-)は、それぞれORFベクターを用いて形質転換した細胞により発現された融合タンパク質とエイズ患者の血清との反応性および非反応性を示す。

【図3】図3はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その1)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図4】図4はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その2)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図5】図5はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その3)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図6】図6はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その4)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図7】図7はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その5)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図8】図8はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その6)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図9】図9はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その7)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図10】図10はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その8)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図11】図11はH T L V - I I I D N Aのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定上のアミノ酸配列(その9)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵

10

20

30

40

50

素部位を示す。

【図12】図12はHTLV-III DNAのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定状のアミノ酸配列(その10)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図13】図13はHTLV-III DNAのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定状のアミノ酸配列(その11)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図14】図14はHTLV-III DNAのヌクレオチド配列、および4つの最も長い読み取り枠の推定状のアミノ酸配列(その12)を示す。ヌクレオチド配列の上に制限酵素部位を示す。

【図15】図15はHTLV-III env - -ガラクトシダーゼ融合タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル上での位置を示すイムノプロットの写真である。

【図16】図16はゲノムが制限酵素EcoRIによって切断される部位、およびHTLV-III DNAを保有する組換えプラスミドの作製を示す。

【図17】図17は組換え構成物ompA1-R-6, ompA2-R-7およびompA3-R-3(この中に1.1KbのEcoRI HTLV-III cDNA制限断片が挿入された)を用いて形質転換した細菌細胞により生産されたペプチドのニトロセルロースフィルター上での位置を示すイムノプロットの写真である。

【図18】図18はompAシグナルペプチドのヌクレオチド配列、および組換えプラスミドompA1-R-6, ompA2-R-7, ompA3-R-3の関連領域を示す。

【図19】図19はHTLV-III DNA組換えプラスミドompA1-R-6を含む大腸菌の溶菌液によるHTLV-III抗原とエイズ血清との間の反応の阻害(レーン1-5)、および大腸菌対照細胞の溶菌液による上記反応の非阻害(レーン6-10)を示すイムノプロットの写真である。

【図20】図20は正常人(レーン1-3)およびエイズ患者(レーン4-11)からの血清中での、HTLV-III cDNAの1.1Kb EcoRI HTLV-III制限断片によりコードされるペプチドに対する抗体の有無を示すイムノプロットの写真である。精製したHTLV-IIIウイルス(パネルA)、または細菌クローンompA1-R-6(O1R6)の全細胞溶菌液(パネルB)を血清試料と反応させた。

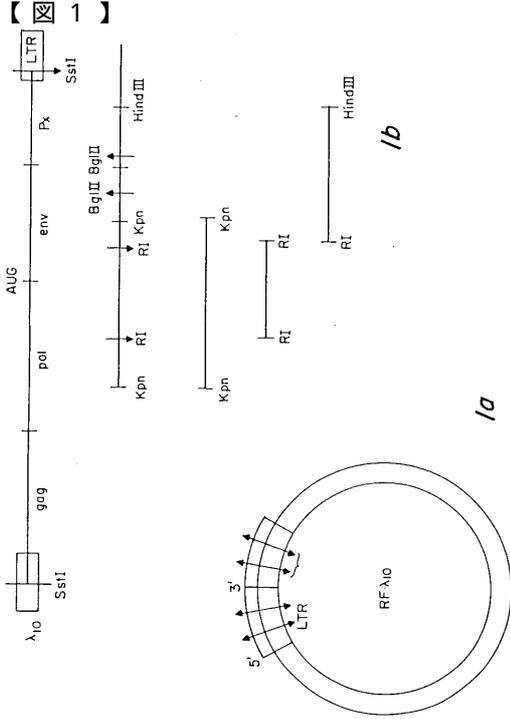
【図21】図21はHTLV-III DNAを有する読み取り枠発現ベクターpMR100を示す。

【図22】図22はラムダCI-HTLV-III - -ガラクトシダーゼ融合タンパク質を示す。図22.AはラムダCI-HTLV-III - -ガラクトシダーゼ融合タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル上での位置を示すイムノプロットの写真であり、図22.Bは上記タンパク質とエイズ患者血清との免疫反応を示す写真である。

10

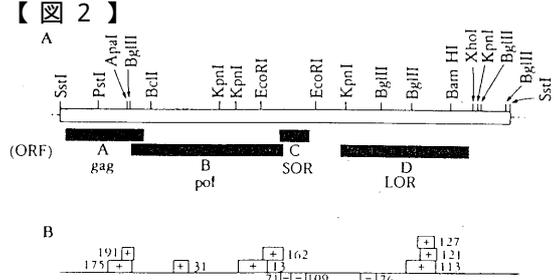
20

30



1

| CLONE | NUCLEOTIDE POSITION | AMINO ACID RESIDUE |
|-------|---------------------|--------------------|
| BH10 | -420 | |
| BH8 | -345 | |
| BH10 | -270 | |
| BH8 | -195 | |
| BH10 | -120 | |
| BH8 | -45 | |
| BH10 | -1 | |
| BH8 | 39 | |
| BH10 | 75 | |
| BH8 | 150 | |
| BH10 | 221 | |
| BH8 | 296 | |
| BH10 | 371 | 13 |
| BH8 | 446 | 39 |



2

| CLONE | NUCLEOTIDE POSITION | AMINO ACID RESIDUE |
|-------|---------------------|--------------------|
| BH10 | 521 | |
| BH5 | 596 | |
| BH10 | 671 | |
| BH5 | 746 | |
| BH10 | 821 | |
| BH5 | 896 | |
| BH10 | 971 | |
| BH5 | 1046 | |
| BH10 | 1121 | |
| BH5 | 1196 | |
| BH10 | 1273 | |
| BH5 | 1348 | |

3

| CLONE | NUCLEOTIDE POSITION | AMINO ACID RESIDUE |
|-------|---------------------|--------------------|
| BH10 | 139 | |
| BH5 | 163 | |
| BH10 | 188 | |
| BH5 | 213 | |
| BH10 | 238 | |
| BH5 | 263 | |
| BH10 | 288 | |
| BH5 | 313 | |

4

| CLONE | NUCLEOTIDE POSITION | AMINO ACID RESIDUE |
|-------|---------------------|--------------------|
| BH10 | 338 | |
| BH5 | 363 | |
| BH10 | 388 | |
| BH5 | 413 | |
| BH10 | 438 | |
| BH5 | 463 | |
| BH10 | 488 | |
| BH5 | 513 | |

【 5 】

BH10 ACCAAGAAGCTTTAGACATGTATAGCGGTTCTATAAAGCTTAAGGCGGACGACGCTCCAGAGGTT 1271
 BH5 -----C-----G-----A-----
 BH10 AAAAAATGGATGACAGAACCTTGTGTCCAAAATGCGAACCAAGTATTAAGAGGATGGG 1346
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 ACCAGCGGCTCACTAGAGAAAGATGATGACGATCATGCGAGTACAGCCCGGCGCATAGCGAAGATTT 1421
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GCGTAGAGCATGACCGAAGTACCAATACAGCTACCAGTAAATGATGACAGAGGCAATTTAGSAAACAGAAA 1496
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GATGGTTAAGTGTTCATTTGTCGAAAAGAGGCGACAGCGAAGAAATTCAGGCGCCTAGAAAAGGCGTG 1571
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 TGGAAATGTGGAAAGAGGACCAACAAATGAAAGATTTACTGAGAGAGCGCTAATTTTGGAGAGATCTG 1646
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GCGTCTTCAAGAGGAAAGGAGGAAATTTCTTCAGAGCAGACAGAGCCAGCCAGCCACCTTTCTTCAGAG 1721
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 AATGAGAGGCGCACTAAAGGAGGACTCTATAGTACAGGAGGATGATAGATTTAGAGAAATGAGTTTG 1846
 BH5 -----A-----A-----A-----

【 6 】

BH10 CCAGAGGTAAGAAACAAAATATAGGAGGAAATGGAGGTTTTTCAAAGTAAAGACATGATCAGATCTC 2021
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 ATAGAAATGTGAGACATAAGCTATAGTATAGTATAGTATAGTATAGTATAGTATAGTATAGTATAG 2096
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 CTGTGACTGAGATGTGACTTTAAATTTGCCCATAGCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAATTAAGCGCA 2171
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GGAATGATGAGCCAAAGTTAAAGATGAGCCATTGACAGAGAAATAAAGCATTACTAGAAATTTGTA 2246
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GAAATGGAAGAGGAGAAATTCGAAATTTGGCGTGAAGTCACTACTGCAATTTGCGATAAG 2321
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 AAAAAAGACTACTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 2396
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GTTCAATAGGAATACACATCCCGAGGTTAAAAAGAAAAAATCAGTAAAGACTGATGTGGGTATGCA 2471
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 TATTTTCAGTCCCTTAGATGAGACTCAGAAAGTATCTGCAATTTACCTACTAGTAAACAAATGAGCA 2546
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 CCAGGATGATTAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 2621
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 ACAAAATCTAGAACCCCTTAAAGAAACCAACCAAGTATCTATCAATCAATGATGATTTGTTATGTA 2696
 BH5 -----A-----A-----A-----

【 7 】

BH10 GSATCTACTAGAAATAGGGGAGCATAGAAAATAAGAGGCTGAGACAACTCTGTGAGTGGGACTT 2771
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 ACCACAGAGAAAACATCAGAAAGAGCTCCATCTTGGATGGTATGAACTCCTCATTAAGTG 2846
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 ACAGTACAGCCTATAGTCTGCGAGAAAAGACAGCTGGACTCAATGACATAGAGAAATGAGTGGGAAATG 2921
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 MATGCGCAATGAGATTTACCAGGAGTTAAAGTAAAGCAATTTAACTCTTAGAGAACCAAGCACTA 2996
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 ACAGAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 3071
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 CATGAGTATATGACCCATCAAAAGCTTAAAGCAAAATAGCAAAATAGCAAGGAGGCGCAATGACATAT 3146
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 CAATTTATCAGAGCCATTTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 3221
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GTAAACATTTAGAGAGCGTGGAAAATTAACACAGAAAGCAATGATTAATGAGGAAAGCTCTAAATTT 3296
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 AAATGAGCTTACAAAGAGAGTGGGAAAGTGGTGGAGACTTTGGAAAGCAGCTCTGCTGAGTGG 3371
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GAGTGTGTAATACCCCTTATGAAATTTAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 3446
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 TTCTATGATGAGTGGGCACTAACAGGAGCAATTAAGAAAACAGATATGTTACTAAGAAAAGAGACA 3521
 BH5 -----A-----A-----A-----

【 8 】

BH10 AAGTGTGCGCCCTAACACACAAATCAGAAATGAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 3596
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GGATTAGAGTAAACATAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 3671
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 TGAGTATGATCAATCAATATAGAGCTGTTAAAGAGGAAAGGCTTCTGCGATGGGATCAGAGAC 3746
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 AAGGAATTTGAGGAAATGAGAAATGATGAAATGATGAAATGATGAAATGATGAAATGATGAAAT 3821
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 ATAGATAGCCCAAGATGAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 3896
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 CCGTATGAGAAAGAAATAGTACCGCTGAGTAAATGATGAAATGATGAAATGATGAAATGATGAAAT 3971
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 GAGTATGAGAAATGAGAAATGAGAAATGAGAAATGAGAAATGAGAAATGAGAAATGAGAAATGAG 4046
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 SCCAGTATATAGAAAGAAATTTCCAGCAAGAACAGGAGCAATTTCCAGCAAGAACAGGATTTT 4121
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 CCAGAAAGTGGCAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 4196
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 TGTGAGTGGGCAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG 4271
 BH5 -----A-----A-----A-----
 BH10 AATAAGAAATTAAGAAATTAAGAAATTAAGAAATTAAGAAATTAAGAAATTAAGAAATTAAGAAAT 4346
 BH5 -----A-----A-----A-----

【 9 】

BH10 931 4421
 BH5 956 4496
 BH10 981 4571
 BH10 1006 4646
 BH5 471
 BH10 1015 471
 BH5 70 4796
 BH10 95 4871
 BH5 120 4946
 BH10 145 5021
 BH5 170 5096

【 10 】

BH10 195 5171
 BH5 203 5246
 BH10 5321
 BH5 5396
 BH10 5471
 BH5 5546
 BH10 5921
 BH5 72 5996

【 97 1 147 172 197 222 247 272 297 322 347 】

BH10 6071
 BH5 6146
 BH10 6221
 BH5 6296
 BH10 6371
 BH5 6446
 BH10 6521
 BH5 6596
 BH10 6671
 BH5 6746
 BH10 6821
 BH5 6996

【 372 397 422 447 472 497 522 547 572 597 622 】

BH10 6996
 BH5 6971
 BH10 7046
 BH5 7121
 BH10 7196
 BH5 7271
 BH10 7346
 BH5 7421
 BH10 7496
 BH5 7571
 BH10 7646

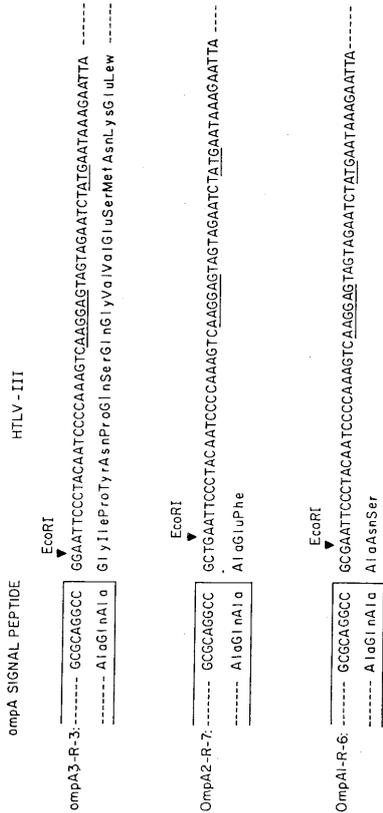
【 97 1 147 172 197 222 247 272 297 322 347 】

BH10 6071
 BH5 6146
 BH10 6221
 BH5 6296
 BH10 6371
 BH5 6446
 BH10 6521
 BH5 6596
 BH10 6671
 BH5 6746
 BH10 6821
 BH5 6996

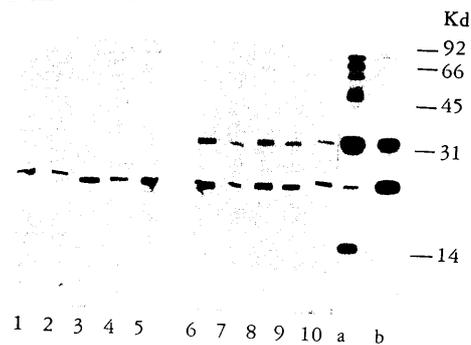
【 372 397 422 447 472 497 522 547 572 597 622 】

BH10 6996
 BH5 6971
 BH10 7046
 BH5 7121
 BH10 7196
 BH5 7271
 BH10 7346
 BH5 7421
 BH10 7496
 BH5 7571
 BH10 7646

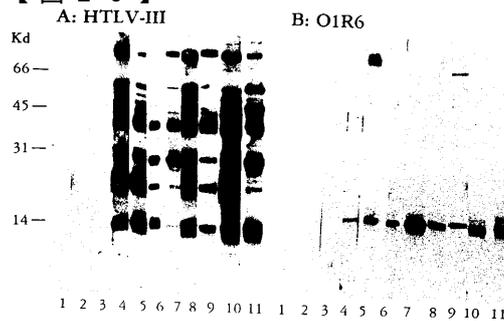
【 18 】



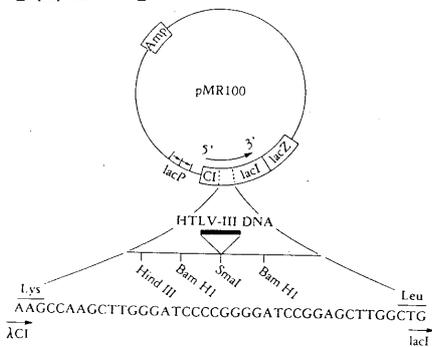
【 19 】



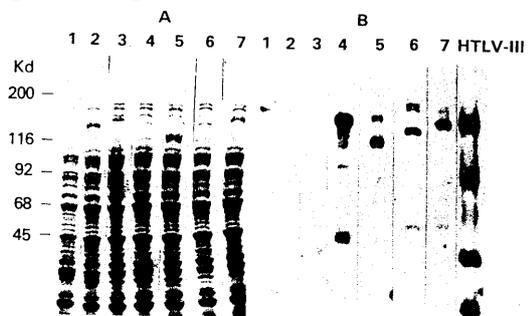
【 20 】



【 21 】



【 22 】



【配列表】

2004224798000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ロバート・シー・ガロ

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 1 7 , ベセスダ , ソーデン・テラス 8 5 1 3

(72)発明者 フロジエ・ウォング - スタール

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 0 , サンディエゴ , モントレー・サイプレス・ウェイ
1 2 7 3 7

F ターム(参考) 4B024 AA14 BA12 BA32 CA01 CA07 DA06 EA04 GA11 HA08
4B050 CC05 LL03
4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA04 DA86 EA53 FA74

