

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 39/12	2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/12		A 6 1 P 31/14	4 B 0 2 4
A 6 1 P 31/14		C 0 7 K 16/40	4 B 0 5 0
C 0 7 K 16/40		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15		1/21	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求（全 90数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 539880(P2001 - 539880)	(71)出願人	パイロファーマ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国19341ペンシルベニア州エク ストン、イーグルビュー・ブルバード40 5番
(86)(22)出願日	平成12年11月21日(2000.11.21)	(71)出願人	ユニバーシティ・オブ・フロリダ UNIVERSITY OF FLOR IDA
(85)翻訳文提出日	平成14年5月17日(2002.5.17)		アメリカ合衆国32611フロリダ州ゲインズビ ル、グリンター・ホール223番
(86)国際出願番号	PCT/US00/31909	(74)代理人	弁理士 青山 葆 （外2名）
(87)国際公開番号	W001/038538		
(87)国際公開日	平成13年5月31日(2001.5.31)		
(31)優先権主張番号	60/167,068		
(32)優先日	平成11年11月23日(1999.11.23)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ポリメラーゼ組成物およびその使用方法

(57)【要約】
ウイルスRNAに指向されるRNAポリメラーゼ蛋白に
関する組成物および方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリメラーゼ活性を有するインタクトなウイルスNS5AB蛋白をコードする核酸、ならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体。

【請求項2】 NS5ABの蛋白分解的開裂のための開裂決定部位が、蛋白分解的開裂がもはや起こらないように変化されている、請求項1記載のポリメラーゼ。

【請求項3】 該核酸が、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスからなる群より選択されるウイルスから単離されるものである、請求項1記載の核酸。

【請求項4】 配列番号：1の配列を有する請求項3記載のペスチウイルス核酸分子、ならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体。

【請求項5】 配列が活性のあるウイルスポリメラーゼをコードしているものである、請求項4記載の配列番号：1を含むベクター。

【請求項6】 配列番号：3の配列を有する請求項3記載のヘパチウイルス核酸分子、ならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体。

【請求項7】 配列が活性のあるウイルスポリメラーゼをコードしているものである、請求項6記載の配列番号：3を含むベクター。

【請求項8】 配列番号：5の配列を有する請求項3記載のヘパチウイルス核酸分子、ならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体。

【請求項9】 配列が活性のあるウイルスポリメラーゼをコードしているものである、請求項8記載の配列番号：5を含むベクター。

【請求項10】 配列番号：2の配列を有するペスチウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白。

【請求項11】 配列番号：4の配列を有するヘパチウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白。

【請求項13】 配列番号：6の配列を有するヘパチウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白。

【請求項14】 配列番号：2のアミノ酸配列を有するポリメラーゼ蛋白をコードする核酸分子。

【請求項15】 配列番号：4のアミノ酸配列を有するポリメラーゼ蛋白をコードする核酸分子。

【請求項16】 配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリメラーゼ蛋白をコードする核酸分子。

【請求項17】 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6からなる群より選択される配列を有するウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白、ならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体。

【請求項18】 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6からなる群より選択される配列を有する蛋白、ならびにそれらの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体ならびに膜フラクションを含む、ウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白組成物。

【請求項19】 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6からなる群より選択される配列を有し、該配列がさらにタグ配列を含むものであるウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白、ならびにそれらの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体。

【請求項20】 タグ配列が、ホモポリマー性核酸配列、ポリヒスチジン、フラッグエピトープ、c-mycエピトープ、インフルエンザAウイルス赤血球凝集素蛋白の膜貫通エピトープ、プロテインA、セルロース結合ドメイン、カルモジュリン結合蛋白、マルトース結合蛋白、キチン結合ドメイン、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、またはビオチンからなる群から選択されるものである、請求項19記載のウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白。

【請求項21】 ウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白に対するモジュレーション活性に関して試験物質をアッセイするための方法であって、下記工程を含む方法：

i) 酵素的に活性のあるウイルスNS5AB蛋白を用意し；

ii) 該蛋白を、ウイルスNS5AB活性をモジュレートする可能性のある試験物質と接触させ；次いで

iii) 該試験物質による該ウイルスNS5AB活性のモジュレーションを測定する。

【請求項22】 ウイルスNS5ABポリメラーゼ蛋白に対するモジュレーション活性に関して試験物質をアッセイする請求項21記載の方法であって、該酵素的に活性のあるウイルスNS5AB蛋白が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6からなる群より選択される配列、ならびにそれらの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体を含むものである方法。

【請求項23】 該NS5ABポリメラーゼが膜フラクションの存在下において用意される、請求項22記載の方法。

【請求項24】 該ウイルスNS5AB蛋白配列がベスチウイルスおよびヘパチウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するものである、請求項21記載の方法。

【請求項25】 ウイルスNS5AB蛋白配列との相互作用に関して試験物質をアッセイする方法であって、下記工程を含む方法：

i) ウイルスNS5ABポリペプチドを用意し；

ii) 該ポリペプチドを、NS5ABポリペプチドと相互作用する可能性のある試験物質と接触させ；次いで

iii) 該試験物質と該NS5ABポリペプチドとの相互作用を測定する。

【請求項26】 該NS5AB蛋白がさらにタグ配列を含むものである、請求項25記載の方法。

【請求項27】 ウイルスNS5AB蛋白配列との相互作用に関して試験物質をアッセイする請求項25記載の方法であって、該配列が配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6ならびにそれらの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体からなる群より選択されるものである方法。

【請求項28】 該NS5AB蛋白がさらにタグ配列を含むものである請求項27記載の方法。

【請求項29】 該NS5ABポリペプチドが膜フラクションの存在下において用意される請求項25記載の方法。

【請求項30】 ウイルスNS5AB核酸配列との相互作用に関して試験物質をアッセイする方法であって、下記工程を含む方法：

i) ウイルスNS5AB核酸を用意し；

i i) 該NS5AB核酸を、ウイルスNS5AB核酸と相互作用する可能性のある試験物質と接触させ；次いで

i i i) 該試験物質と該ウイルスNS5AB核酸との相互作用を測定する。

【請求項31】 該ウイルスNS5AB核酸配列がベスチウイルスおよびヘパチウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するものである、請求項30記載の方法。

【請求項32】 該ウイルスNS5AB核酸配列が配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、ならびにそれらの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体からなる群より選択されるものである、請求項31記載の方法。

【請求項33】 生物学的試料中における、ウイルスポリペプチドと、ベスチウイルスおよびヘパチウイルスからなる群から選択されるウイルスに指向された抗体との間の免疫学的相互作用を検出する方法であって、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6からなる群より選択されるNS5ABアミノ酸配列、ならびにそれらの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体を用いて該抗体を単離することを含む方法。

【請求項34】 配列番号：2、配列番号：4および配列番号：6からなる群より選択される配列を有するウイルスポリペプチドならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体に対するアフィニティーを有する抗体。

【請求項35】 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5からなる群より選択される配列を有する核酸、ならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体を宿主中に導入する方法であって、該核酸が、形質転換、トランスフェクション、トランスダクション、遺伝子導入法、外科的方法および核酸被覆粒子の物理的爆撃からなる群より選択される方法により該宿主にデリバリーされるものである方法。

【請求項36】 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6およびそれらの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むウイルス抗原。

【請求項37】 蛋白タグ配列をさらに含む請求項36記載のウイルス抗原

【請求項38】 哺乳動物対象において免疫応答を生起させる方法であって

、請求項1記載の核酸によりコードされるウイルス抗原を該対象に投与することを含む方法。

【請求項39】 哺乳動物対象において免疫応答を生起させる方法であって、請求項37記載のウイルス抗原を該対象に投与することを含む方法。

【請求項40】 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5からなる群より選択されるウイルスNS5AB核酸、ならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体を含む宿主細胞。

【請求項41】 該宿主細胞が、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、哺乳動物細胞および植物細胞からなる群より選択されるものである、請求項40記載の宿主細胞。

【請求項42】 請求項40記載の宿主細胞由来の細胞系であって、該細胞系由来の細胞はウイルスによりコードされているNS5ABポリメラーゼ蛋白をコードする核酸を含み、該核酸は配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、ならびに配列番号：1、配列番号：3および配列番号：5の天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体からなる群より選択されるものであり、ウシ細胞、ヒツジ細胞、ブタ細胞、肝細胞、Hu h - 7細胞、Chang肝細胞、HeLa細胞、U937細胞、HepG2細胞、MT-4細胞、造血細胞および該細胞系から生じるクローン細胞からなる群より選択されるものである細胞系。

【請求項43】 機能的なNS5AB蛋白を発現する請求項42記載の細胞系。

【請求項44】 さらにレポーターシステムを含む請求項43記載の細胞系であって、該レポーターシステムからのレポートシグナルが、該細胞中の機能的ウイルスNS5AB蛋白のポリメラーゼ活性に依存するものである細胞系。

【請求項45】 該レポーターシステムが機能的なレポーター分子をコードするRNA分子のアンチセンス鎖を含む核酸を含み、該NS5ABポリメラーゼが該アンチセンス分子に作用して該宿主細胞中に翻訳可能なmRNA配列を生じさせ、該翻訳されたレポーター分子配列が機能的なNS5ABポリメラーゼの存在を示すシグナルを増大させうるものである、請求項44記載の細胞系。

【請求項46】 該機能的mRNA分子が、ルシフェラーゼ、 β -ガラクト

シダーゼ、アルカリ性ホスファターゼまたは蛍光緑色蛋白からなる群より選択されるレポーター分子をコードしているものである請求項45記載の細胞系。

【請求項47】 ウイルスによりコードされるNS5ABポリメラーゼ蛋白の機能性を評価する方法であって、下記工程を含む方法：

i) 請求項41記載の細胞系を用意し；

ii) アンチセンス分子をコードする核酸で該細胞を形質転換し；ここに該アンチセンス分子の相補鎖は機能的なレポーター分子をコードしており、該NS5ABポリメラーゼは該アンチセンス分子に作用して翻訳可能なmRNA配列を該宿主細胞中に生じさせるものであり；次いで

iii) 該翻訳されたレポーター分子配列により生じたシグナルの増大に関して該細胞を評価する；ここに該増大が機能的なNS5AB蛋白の存在を示すものである。

【請求項48】 該機能的レポーター分子が、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼまたは蛍光緑色蛋白からなる群より選択されるものである請求項47記載の方法。

【請求項49】 ヘパチウイルスおよびベスチウイルスからなる群より選択されるウイルスに対するモジュレーション活性に関して試験物質をアッセイする方法であって、下記工程を含む方法：

i) 請求項41記載の細胞系を用意し；

ii) 該細胞系を、NS5AB活性をモジュレートする可能性のある試験物質と接触させ；次いで

iii) NS5ABポリメラーゼ活性に対する試験物質のモジュレーション活性があればそれを測定する。

【請求項50】 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5からなる群より選択されるウイルスNS5AB核酸、ならびにその天然対立遺伝子変種、変異体および開裂されない誘導体をウイルスベクターまたはレプリコン中に組み込むことを含む、感染性のウイルスベクターまたはレプリコンを得る方法。

【請求項51】 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、ならびに配列番号：1、配列番号：3および配列番号：5の天然対立遺伝子変種、変異体お

よび誘導体からなる群より選択される核酸配列を含む宿主動物。

【請求項52】 ヘパチウイルスおよびペスチウイルスからなる群より選択されるウイルスまたはレプリコンで細胞培養物を感染させる方法であって、請求項50記載のごとく得られたウイルスベクターまたはレプリコンを投与することを含む方法。

【請求項53】 ヘパチウイルスおよびペスチウイルスからなる群より選択されるウイルスまたはレプリコンで動物を感染させる方法であって、請求項50記載のごとく得られたウイルスベクターまたはレプリコンを投与することを含む方法。

【請求項54】 ウイルスNS5B蛋白および脂質含有膜フラクションまたはミセル調合物を含む組成物。

【請求項55】 生物学的試料中のNS5AB核酸の存在を検出するためのキットであって、下記のものを含むキット：

i) 配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5からなる群に示された配列に由来するNS5AB核酸配列、その天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体；ここに該核酸配列は該NS5ABをコードする核酸にハイブリダイゼーション可能なものであり；

ii) 反応バッファー；および

iii) 説明書。

【請求項56】 該核酸配列がタグを含むものである請求項55記載のキット。

【請求項57】 生物学的試料中のペスチウイルスまたはヘパチウイルス抗原の存在を検出するキットであって、下記のものを含むキット：

i) ペスチウイルスまたはヘパチウイルスのNS5AB蛋白に対して免疫学的に特異的な抗体；

ii) 陽性対照としての固定化されたNS5AB抗原を伴う固体支持体；および

iii) 説明書

【請求項58】 該抗体がタグを含むものである請求項57記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、ペスチウイルス (pestivirus)、ヘパチウイルス (hepacivirus) および関連ウイルス群に関し、より詳細には、これらのウイルスによりコードされるRNA-指向RNAポリメラーゼ (RdRp) 活性および配列に関する。融合NS5A-NS5B RdRpをコードする配列およびかかる配列から発現される機能的なRdRp蛋白 (本明細書ではNS5ABという) ならびにそれらを含む組成物が開示される。かかる組成物は予防的、治療的、診断上および医薬上の用途を有する。

【0002】**発明の背景**

ペスチウイルスおよびヘパチウイルスは、フラビウイルス科に属する密接に関連したウイルス群である。この科における他の密接に関連したウイルスはGBウイルスA、GBウイルスA様物質、GBウイルス-BおよびGBウイルス-C (G型肝炎ウイルス、HGVともいう) である。ペスチウイルス属は、ウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、古典的なブタ発熱ウイルス (CSFV; ブタコレラウイルスともいう) およびヒツジ国境病ウイルス (BDV) からなる。家畜 (ウシ、ブタおよびヒツジ) のペスチウイルス感染は世界的な重大な経済的損失を生じさせる。ヒトペスチウイルスは動物のペスチウイルスほどには十分に特徴付けられていない。

しかしながら、血清学的研究により、ヒトにおいてかなりのペスチウイルスへの曝露があることが示されている。ヘパチウイルス群 (C型肝炎ウイルス; HCV) は、多くの密接に関連しているが遺伝子型的には異なるウイルスからなり、それらはヒトに感染する。HCVは世界的に見て肝炎の主な原因である。大部分のHCV感染は持続的であり、約75%の症例が慢性肝臓疾患を発症する。慢性HCV感染は肝硬変、肝細胞カルチノーマおよび肝不全の発症につながる。

【0003】

現在、ペスチウイルス感染および関連疾患を予防または治療する抗ウイルス性

医薬はない。HCVによるヘパチウイルスの治療には、米国においてインターフェロン α (IFN)の使用が承認されている。最近になって、IFNおよびリバビリン(1- β -D-リボフラノシル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-カルボキシアミド)の組み合わせの使用が承認された。IFN治療は、20~40%の患者における改善された血清酵素応答に関連している。残りの患者はIFNに無応答である。応答者に関して、持続的な臨床的改善はわずか10~20%の患者においてしか見られない。大部分の患者はIFN治療中止後にぶり返す。かくして、慢性C型肝炎に対するIFN治療の有効性は様々であり、その治癒率は低い。そのうえ、かかる治療はしばしばかなりの副作用を伴う。ペスチウイルス、ヘパチウイルスおよび関連ウイルスにより引き起こされる感染および疾病に対する新たな治療および予防剤が明らかに必要である。

【0004】

ペスチウイルスおよびヘパチウイルスの遺伝学的構成は非常に類似している。これらの+鎖RNAウイルスは、ウイルス複製に必要なすべてのウイルス蛋白をコードする単一の大きなオープンリーディングフレーム(ORF)を有する。これらの蛋白は、細胞およびウイルスによりコードされるプロテイナーゼにより翻訳と同時または翻訳後にプロセッシングされて成熟ウイルス蛋白となるポリ蛋白(polyprotein)として発現される。ウイルスゲノムRNAの複製に関与するウイルス蛋白はORFのカルボキシ末端側のほぼ3分の2に存在し、非構造(NS)蛋白と呼ばれる。ORFの非構造蛋白部分の遺伝学的構成およびポリ蛋白プロセッシングは、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスに関しては、著しく類似している。ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのいずれに関しても、成熟非構造(NS)蛋白は_{NH₃}[...p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B]_{COOH}からなる(順に、非構造蛋白コーディング領域のアミノ末端からORFのカルボキシ末端へと示す)。

【0005】

ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS蛋白は、特異的蛋白機能の特徴とする配列ドメインを共有している。例えば、両群のウイルスのNS3蛋白は、セリンプロテイナーゼおよびヘリカーゼの特徴を有するアミノ酸配列モチーフを有

する (Gorbalenya et al. (1988) Nature 333:22; Bazan and Fletterick (1989) Virology 171:637-639; Gorbalenya et al. (1989) Nucleic Acid Res. 17:3889-3897)。同様に、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5B蛋白はRNA-指向RNAポリメラーゼ (RdRp) の特徴を有するモチーフを有する (Koonin, E. V. and Dolja, V. V. (1993) Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 28:375-430)。

【0006】

そのうえ、ウイルス生活環におけるペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS蛋白の実際の役割および機能は直接的に類似している。いずれの場合においても、NS3セリンプロテイナーゼは、ORF中のその位置よりも下流のポリ蛋白前駆体のすべての蛋白分解的プロセッシングに関与している (Wiskerchen and Collett (1991) Virology 184:341-350; Bartenschlager et al. (1993) J. Virol. 67:3835-3844; Eckart et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Comm. 192:399-406; Grakoui et al. (1993) J. Virol. 67:2832-2843; Grakoui et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10583-10587; Hijikata et al. (1993) J. Virol. 67:4665-4675; Tomei et al. (1993) J. Virol. 67:4017-4026)。いずれの場合においても、NS4A蛋白はNS3セリンプロテアーゼのコファクターとして作用する (Bartenschlager et al. (1994) J. Virol. 68:5045-5055; Falla et al. (1994) J. Virol. 68:3753-3760; Lin et al. (1994) 68:8147-8157; Xu et al. (1997) J. Virol. 71:5312-5322)。両方のウイルスのNS3蛋白はヘリカーゼとしても作用する (Kim et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Comm. 215:160-166; Jin and Peterson (1995) Arch. Biochem. Biophys. 323:47-53; Warrenner and Collett (1995) J. Virol. 69:1720-1726)。最後に、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5B蛋白は推定上のRdRp活性を有する (Behrens et al. (1996) EMBO J. 15:12-22; Lohmann et al. (1997) J. Virol. 71:8416-8428; Yuan et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 232:231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033 [PCT/US96/15571]; Collett, Provisional Patent Appl. 60/080,509; Zhong et al. (1998) J. Virol. 72:9365-9369)。

【0007】

上述のごとく、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスの成熟NS蛋白は前駆体ポリ蛋白の蛋白分解的プロセッシングにより生じる。ペスチウイルスの場合には、成熟NS5AおよびNS5B蛋白になる前駆体ポリ蛋白は、p133と命名された「NA5AB」蛋白である(Petric et al. (1992) J. Gen. Virol. 73:1867-1871)。p133はBVDV-感染細胞に存在することが示されているが、前駆体ポリ蛋白を介するウイルス複製におけるその機能役割は記載されていない。ヘパチウイルスは、オーセンティックなウイルスポリ蛋白前駆体を同定し研究するに十分なほど培養細胞中で有効に増殖しないので、ヘパチウイルスNS5AB蛋白の存在はこれまで記載されていない。

【0008】

フラビウイルス科の中に第3の属が存在する：それはより関係の薄いフラビウイルスである。フラビウイルスのゲノム構成および複製方法はペスチウイルスおよびヘパチウイルスのそれとは異なる。例えば、フラビウイルスのゲノムRNAの5'末端はキャップされており、リボソームスキニングにより遺伝子発現を示すものである。このことは、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのキャップされていないRNAおよび翻訳用の内部リボソームエンタリー部位を含む長い5'NTRとは対照をなす。かくして、フラビウイルスにより用いられる遺伝子発現機構はペスチウイルスおよびヘパチウイルスにより用いられる機構とは根本的に異なる。フラビウイルスの成熟NS蛋白は_{NH3}[...NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5]_{COOH}からなる(順に、非構造蛋白コーディング領域のアミノ末端からORFのカルボキシ末端へと示す)。

【0009】

蛋白機能を推定する配列モチーフもフラビウイルスORF中に存在する。フラビウイルスNS3蛋白は、それが三機能性蛋白であることを示唆するモチーフを含んでいる(Rice, in Fields Virology, 3rd edition, pp. 931-959 (Lippincott-Raven, NY))。実際、フラビウイルスのNS3は、ORF中のその位置の上流および下流の両方におけるポリ蛋白のプロセッシングに関与するトリプシン様プロテイナーゼ活性、おそらくRNA複製に関与するであろうRNAヘリカーゼ

活性(WO97/27334)ならびにフラビウイルスRNAの5'末端キャップ構造の形成に関与している可能性のあるRNAトリホスファターゼ活性を有している。フラビウイルスNS5蛋白はRdRp配列モチーフを有し、RdRp活性を有することが示されている(Tan et al. (1996) Virology 216:317-325)。フラビウイルスNS5蛋白はメチルトランスフェラーゼに特徴的な配列モチーフも有する。フラビウイルスNS5蛋白のこのドメインは5'キャップ構造のメチル化に関与している可能性がある。対照的に、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのRNAは5'キャップ構造を欠く。この相違と矛盾せずに、NS5AおよびNS5B蛋白のコーディング領域を含むペスチウイルスおよびヘパチウイルスのORFはメチルトランスフェラーゼモチーフを欠く(Koonin, E. V. (1993) J. Gen. Virol. 74:733-740)。このことは、フラビウイルスのRdRp蛋白(NS5)とペスチウイルスおよびヘパチウイルスのRdRp蛋白(NS5B)との間の重要な機能上の相違および識別的特徴である。

【0010】

蛋白分解的にプロセッシングされる前駆体ポリ蛋白を経てRdRp蛋白を生産する+鎖動物RNAウイルスの中には、前駆体ポリ蛋白が機能的なRdRp活性を有することを示すものはなかった。実際に、2つの十分に研究されたケースにおいて、RdRp蛋白の直接のポリ蛋白前駆体はRNAポリメラーゼとして無機能であることが示されている。ポリオウイルスに関しては、3Dpolと呼ばれる機能的なRdRp蛋白は前駆体3CDproに由来し、該前駆体は2つの成熟ウイルス蛋白3Cproおよび3Dpolの融合物である。RNAポリメラーゼ活性を直接評価した場合には、精製3CDproは検出可能な活性を欠いていた(Van Dyke and Flanagan (1980) J. Virol. 35:732-740; Harris et al. (1992) J. Virol. 66:7481-7489)。アルファウイルスの場合には、ポリ蛋白前駆体P1234は迅速にプロセッシングされてP123および成熟RdRp nsP4になる。P123はnsP4と一緒に細胞においてウイルスRNAを合成することができるが、前駆体P1234はできない(Lemm, Rumenapf, Strauss, Strauss and Rice (1994))。そのうえ、遺伝子操作されたワクシニアウイルス発現系を用いて、ポリ蛋白P34は細胞においてウイルスRNAを合成すること

ができないことが直接示されている (Lemm and Rice (1993) 67:1916-1626)。
上記のことはすべて、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5B RdRpの前駆体蛋白(本明細書ではNS5ABという)は活性のあるポリメラーゼとして機能するとは考えられないということを示唆するものである。

【0011】

発明の概要

本発明は、本明細書においてNS5ABと称されるNS5B RdRp前駆体蛋白が、実際には、活性のあるRdRp酵素であるという知見に基づく。本来の順序で連結されているNS5AおよびNS5Bを有する配列をコードするNS5AB、NS5AB蛋白ならびに診断、予防、治療および医薬用途に有用なそれらの関連活性が提供される。有効な抗ウイルス剤を同定するためのアッセイにおいて本発明のNS5AB関連分子を有利に用いてもよい。

【0012】

本発明の好ましい具体例において、本発明のクローンDJB2-BVDV-NS5AB中に存在する、配列番号：1に示されるペスチウイルスNS5AB遺伝子であるDNA配列を含む単離核酸分子が提供される。典型的なBVDV NS5AB蛋白は、上記クローンによりコードされる配列番号：2に示すアミノ酸配列を有する。

【0013】

本発明の種々の具体例によれば、ペスチウイルスのいずれかの株、変種、セロタイプまたは遺伝子型に由来するような配列番号：1に関連したDNAまたはRNA、さらなる核酸分子、ならびにそれらによりコードされるNS5AB蛋白は本発明の範囲内である。さらに、これらの配列の保存的な配列または残基の置換を有するペスチウイルスNS5AB配列、あるいは変種または誘導体の核酸および蛋白を生じるように変異または修飾された配列も、本発明の範囲内にあるものとする。

【0014】

本発明のもう1つの好ましい具体例において、本発明のクローンbacHCV5AB-11中に存在する、配列番号：3に示すヘパチウイルスNS5AB遺伝

子であるDNA配列を含む単離核酸分子が提供される。典型的なヘパチウイルスNS5AB蛋白は、上記クローンによりコードされる配列番号：4に示すアミノ酸配列を有する。

【0015】

本発明のさらに好ましい具体例において、本発明のクローンbacHCV5AB-16中に存在する、配列番号：5に示すヘパチウイルスNS5AB遺伝子であるDNA配列を含む単離核酸分子が提供される。典型的なヘパチウイルスNS5AB蛋白は、上記クローンによりコードされる配列番号：6に示すアミノ酸配列を有する。

【0016】

本発明の種々の具体例によれば、ヘパチウイルスのいずれかの株、変種、セロタイプ、遺伝子型に由来するような、配列番号：3または配列番号：5の核酸配列に関連した核酸配列であるさらなる核酸分子、ならびにそれらによりコードされるNS5AB蛋白は本発明の範囲内である。さらに、これらの配列の保存的な配列または残基の置換を有するヘパチウイルスNS5AB配列、あるいは変種または誘導体の核酸および蛋白を生じるように変異または修飾された配列も、本発明の範囲内にあるものとする。

【0017】

本発明のさらにもう1つの具体例において、ペスチウイルスおよびヘパチウイルス由来の機能的なNS5AB蛋白およびポリペプチド（例えば、RdRpまたは他の活性を有するNS5AB蛋白およびポリペプチド）が提供される。これらの機能的NS5AB蛋白およびポリペプチドは、かかる機能的NS5AB蛋白およびポリペプチドの活性をモジュレートし、あるいは阻害または刺激しうる作用剤の同定（これに限らない）を包含する多くの有用性を有する。

【0018】

ペスチウイルスおよびヘパチウイルスの感染および関連疾病の治療または予防において有効でありうる潜在的な抗ウイルス剤をアッセイするための、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスに由来するNS5AB配列および蛋白の使用方法が本発明において提供される。

【0019】

上記のごとく、変種蛋白またはポリペプチドをコードする核酸は本発明の範囲内にあるとされる。かかる変種はR d R pポリメラーゼ活性を有していてもよく、有していなくてもよい。これらの変種は、1またはそれ以上のアミノ酸残基の付加、欠失、または置換を包含する、1またはそれ以上の変化を有していてもよい。好ましくは、該変化はポリペプチドの構造または有用な特性に影響しないもの、あるいは実質的に影響するものであろう。かくして、適当には、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5AB変種は機能的なR d R p活性を有するものであってもよく、あるいはそれらはほとんど機能的でないかまたは不活性であってもよいが、もとのポリペプチドの2次および3次構造を実質的に含むものであってもよい。かかるNS5AB分子を有利に用いて、NS5ABに特異的に結合、あるいはNS5AB活性に影響する作用剤を同定してもよい。NS5AB変種は天然に存在するもの（すなわち、天然ソースから精製または単離されたもの）あるいは合成されたもの（すなわち、遺伝子工学的な方法、部位特異的突然変異誘発法により得られたDNAまたはRNAの生物学的発現により得られる、あるいは化学合成法により得られるもの（これらすべての方法は当該分野においてよく知られている））であってもよい。

【0020】

本発明のさらにもう1つの具体例において、本発明の核酸分子がクローニングされ、ベクター中で発現される。かかるベクターは、例えば、プラスミド、複製コンピテントまたは欠損ウイルスまたはファージベクター、あるいは典型的には複製開始点が提供されたレプリコンの形態であってもよく、ポリペプチド発現用のプロモーター、およびプロモーターのレギュレーターが提供されてもよい。ベクターは、1またはそれ以上の選択可能マーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合にはアンピシリン耐性遺伝子あるいは哺乳動物ベクターの場合にはネオマイシン耐性遺伝子を含んでいてもよい。例えば、RNAまたは蛋白の産生に関するインビトロアッセイにおいてベクターを有利に用いてもよい。宿主細胞または生物を形質転換、トランスフェクション、感染またはトランスダクションするためのベクターも、本発明において使用されるものとする。得られる宿主細胞お

よび生物であって、ペスチウイルスまたはヘパチウイルスの核酸配列またはポリペプチドを有し、あるいは発現するものは、NS5AB蛋白の活性に影響する作用剤を同定するためのアッセイにおいて有用性があるだろう。

【0021】

本発明のさらにもう1つの具体例において、NS5ABポリメラーゼ配列に影響する作用剤の同定方法が提供される。かかる方法は、多数の作用剤を評価できるアッセイの方法ならびに高処理量スクリーニング法を包含する。そのようにして同定された作用剤は、NS5AB配列またはそれによりコードされる蛋白に対する影響において、アンタゴニスト性またはアゴニスト性であってよい。小型分子、ポリマー、ペプチド、ポリペプチド、免疫グロブリンまたはそれらのフラグメント、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、ペプチド-核酸抱合体、リボザイム、ポリヌクレオチド等（これらに限らない）を包含する、いかなる数のクラスの分子であっても、本発明の方法に使用できる。NS5AB活性のアンタゴニストに関する有用性は、生きた宿主またはヒト、ならびに細胞、組織および器官の培養物のごときインビトロ系におけるペスチウイルスおよびヘパチウイルスの複製に対する阻害を包含するが、これに限らない。本発明の実施により同定されるペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5AB活性のアゴニストも、生きた宿主およびインビトロ系において多くの有用性がある。例えば、かかる作用剤は、これらのウイルスの成長、製造または増殖を改善することにおいて有用であろう。ペスチウイルスおよびヘパチウイルスの改善されたインビトロでの増殖は、研究用および診断用試薬の製造ならびにワクチン製造に有利である。特に、かかる作用剤は、HCV感染、複製または疾病の動物モデルの開発、および生きた宿主あるいは細胞、組織または器官の培養系におけるHCVの増殖に有用である。

【0022】

本発明のもう1つの態様によれば、本明細書に開示した組成物および方法の使用を容易にするキットが提供される。典型的なキットは、単独の、あるいは適当なベクターに結合された本発明のNS5AB核酸およびポリペプチドあるいはそれらの変種を含む。本発明の1の典型的なキットは、試験試料中のNS5AB核

酸の検出に適した核酸プローブまたはプライマーを含む。あるいはまた、本発明の典型的なキットは、ペスチウイルスまたはパチウイルスのNS5AB蛋白に免疫学的に特異的な抗体および免疫検出を容易にするための他の試薬を含む。陽性対照として、固定化されたNS5AB抗原を含有する固体支持体にかかるキットに含めてもよい。本明細書に記載されたキットには、特定用途の場合の本発明の組成物の使用プロトコルならびに適用の際に必要な試薬も含められる。キットの試薬は意図される用途により変更されうる。かかる試薬は、バッファー、溶媒、培地および溶液、基質およびコファクター、ベクターおよび宿主細胞、ならびに検出またはレポーター試薬を包含するが、これらに限らない。バイアル、容器および反応チャンバーのごとき他のアクセサリーが含まれていてもよい。

【0023】

本発明の主題を理解するための助けとなるよう、以下に定義を示す。

本明細書の用語「C型肝炎ウイルス」、「HCV」または「ヘパチウイルス」は、フラビウイルス科のヘパチウイルス属に属する関連ウイルスの群のいずれかの典型を意味する。また、GBウイルスA、GBウイルスA様作用剤、GBウイルス-BおよびGBウイルス-CまたはG型肝炎ウイルス(HGV)と命名された、密接に関連するウイルスについても用語「ヘパチウイルス」を用いる。「ペスチウイルス」または「BVDV」(ウシウイルス性下痢ウイルス)は、フラビウイルス科のペスチウイルス属に属する関連ウイルスの群のいずれかの典型を意味し、BVDウイルス、国境病(border disease)ウイルス、古典的なブタ発熱ウイルス(ブタコレラウイルス)、キリン、バイソン、他の動物およびヒトを包含する他の種のペスチウイルスを包含するが、これらに限らない。

【0024】

本明細書の用語「核酸」または「核酸分子」は直鎖状または環状の1本鎖または2本鎖のDNAまたはRNA分子をいい、1本鎖の場合にはその相補的配列の分子もいう。核酸分子を議論する場合、本明細書において特定の核酸分子の配列または構造を通常の記載慣習に従って5'から3'の向きに記載することがある。本発明の核酸に関して、用語「単離核酸」を時々用いる。この用語は、DNAについて用いる場合、その起源生物の天然ゲノム中において隣接して連続してい

る配列から分離されたものである。例えば、「単離核酸」はプラスミドまたはウイルスベクターのごときベクター中に挿入されたDNA分子を含んでいてもよく、あるいは原核細胞もしくは真核細胞または宿主生物のゲノムDNA中に組み込まれていてもよい。

【0025】

RNAについて用いる場合、用語「単離核酸」は、主として、上記単離DNA分子によりコードされるRNA分子をいう。あるいはまた、その用語は、その天然状態（すなわち、細胞または組織中）において結合している他の核酸から十分に分離されたRNA分子をいうこともある。さらに単離核酸（DNAまたはRNA）は、生物学的または合成的手段により直接生産され、その生産中に存在する他の成分から分離されているものをいうことがある。

【0026】

核酸の特定配列の「天然対立遺伝子変種」、「変異体」および「誘導体」は、特定配列に密接に関連しているが、配列または構造中の自然発生的または設計された変化を有していてもよい核酸配列をいう。密接に関連とは、配列のヌクレオチドの少なくとも60%、しばしば90%より多くが、特定の配列番号を用いて表される核酸配列の一定の長さにわたって合致することを意味する。密接に関連した核酸配列間の核酸配列中の変化または相違は、特定の核酸配列の複製または重複の過程において自然に起こる配列中のヌクレオチド変化をいうことがある。他の変化は、特別な目的のために特別に設計され特別な配列中に導入されたものであってもよい。かかる特別な変化を、種々の突然変異法を用いてインビトロにおいて生じさせてもよく、あるいは変化を誘導または選択する特定の選択条件下において宿主生物中で生じさせてもよい。特別に得られるかかる配列の変種を、元の配列の「変異体」または「誘導体」といってもよい。

【0027】

用語「類似性パーセント」、「同一性パーセント」および「相同性パーセント」は、特定の核酸についていう場合、ウィスコンシン大学GCGソフトウェアプログラム中に示されたように用いる。

【0028】

用語「NS5B」は、「NS5B蛋白」、「NS5Bポリペプチド」、「NS5Bポリメラーゼ」、「NS5B RdRp」またはこれらの用語の組み合わせを用いて呼ばれる蛋白をコードする領域を特定するウイルスゲノムの3'末端付近にあるHCVゲノム的一部分をいう。天然状態のNS5BはRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)として機能する。NS5B蛋白をコードする核酸領域を「NS5B遺伝子」ということもある。よって、用語「NS5B」は、それが用いられる文脈に応じて、NS5Bポリペプチドをコードする核酸、NS5B遺伝子またはNS5Bポリペプチド、あるいはそれらの部分をいうことがある。さらにNS5Bは、NS5B核酸配列またはNS5Bポリペプチドの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体をいうことがある。NS5B核酸、NS5B遺伝子またはNS5B蛋白は機能的であってもよく、あるいは機能的でなくてもよい。

【0029】

用語「NS5AB」は、ウイルスゲノムの3'末端付近に位置するペスチウイルスまたはヘパチウイルスゲノム的一部分をいい、本明細書において「NS5AB」と称されるNS5AおよびNS5B蛋白と一緒にコードする領域を特定するものである。「NS5AB」、「NS5AB蛋白」、「NS5ABポリペプチド」、「NS5ABポリメラーゼ」、「NS5AB RdRp」またはこれらの用語の組み合わせを本明細書において混用する。NS5AB蛋白は、成熟NS5AおよびNS5B蛋白となるポリ蛋白または前駆体である。天然の共直線状態においてNS5AおよびNS5B配列は連結され、並んでいる。NS5AB蛋白をコードする核酸領域は「NS5AB遺伝子」とも称される。かくして、用語「NS5AB」は、用語が用いられる文脈に応じて、NS5ABポリペプチドをコードする核酸、NS5AB遺伝子、またはNS5ABポリペプチド、あるいはそれらのいずれかの部分をいう。さらにNS5ABは、NS5AB核酸配列またはNS5ABポリペプチドの天然対立遺伝子変種、変異体および誘導体をいうことがある。NS5AB核酸、NS5AB遺伝子またはNS5AB蛋白は機能的または非機能的のいずれであってもよい。本発明のNS5AB配列の開裂されない誘導体は、ウイルスまたは他の蛋白分解酵素によってはもはや蛋白分解的に開裂されな

いように修飾された配列である。

【0030】

また本発明は、本発明のペスチウイルスおよびヘパチウイルスの NS5AB ポリペプチドまたは蛋白の活性部分、フラグメント、誘導体および機能的もしくは非機能的模倣物を包含する。NS5AB の「活性部分」は、全長の NS5AB ポリペプチドより小さいが、測定可能な生物学的活性を保持しているペプチドを意味する。

【0031】

NS5AB ポリペプチドの「フラグメント」、「部分」は、少なくとも約 5 個ないし 7 個の連続したアミノ酸、しばしば少なくとも約 7 個ないし 9 個の連続したアミノ酸、典型的には少なくとも約 9 個ないし 13 個の連続したアミノ酸、そして最も好ましくは少なくとも約 12 個ないし 30 個またはそれ以上の連続したアミノ酸からなるアミノ酸残基の並びを意味する。NS5AB ポリペプチド配列、抗原決定基、ウイルス性抗原またはエピトープのフラグメントは、NS5AB アミノ酸配列の一部に対する免疫応答を誘導するために有用である。

【0032】

NS5AB ポリペプチドまたはそのフラグメントの「誘導体」は、蛋白のアミノ酸配列を変化させることにより、例えば、蛋白をコードする核酸を処理することにより、あるいは蛋白自体を変化させることにより修飾されたポリペプチドをいう。天然アミノ酸配列のかかる誘導体は、1 個またはそれ以上のアミノ酸挿入、付加、欠失または置換を包含してもよく、元の NS5AB ポリペプチドの必須活性を変化させるものであってもよく、変化させないものでもよい。

【0033】

上記のごとく、本発明の NS5AB ポリペプチドまたは蛋白は、HCV NS5B ポリペプチドに由来し、NS5AB ポリペプチドの少なくとも 1 の特性または他の特徴を保持しているアナログ、フラグメント、誘導体または変異体を包含する。NS5AB ポリペプチドの異なる「変種」は天然に存在する。これらの変種は、蛋白をコードする遺伝子のヌクレオチド配列の相違により特徴づけられる対立遺伝子であってもよく、あるいは異なる RNA プロセッシングまたは翻訳後

修飾を含むものであってもよい。当業者は、1個または複数個のアミノ酸の置換、欠失、付加または置換を有する変種を製造することができる。これらの変種は、とりわけ、(a) 1個またはそれ以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸で置換されている変種、(b) 1個またはそれ以上のアミノ酸がNS5ABポリペプチドに付加されている変種、(c) 1個またはそれ以上のアミノ酸が置換基を有する変種、ならびに(d) NS5ABポリペプチドが、例えば抗体に対するエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分等のような有用な特性をNS5ABポリペプチドに付与しうる融合パートナー、蛋白タグまたは他の化学的部分のごとき別のペプチドまたはポリペプチドと融合している変種、を包含しうる。本発明の他のNS5ABポリペプチドは、1の種に由来するアミノ酸残基が保存的位置または非保存的位置において別の種の対応残基で置換されている変種を包含する。もう1つの具体例において、非保存的位置におけるアミノ酸残基が保存的または非保存的残基で置換される。遺伝学的(抑制、欠失、突然変異等)、化学的、および酵素的方法を包含するこれらの変種を得る方法は当業者に知られている。

【0034】

別の核酸プロセッシング形態ならびに別の修飾後修飾形態を包含する、かかる対立遺伝子変種、アナログ、フラグメント、誘導体、変異体、および修飾体は、HCV NS5Bポリペプチドの生物学的特性を保持するNS5ABポリペプチドの誘導体を生じ、それらは本発明の範囲内に包含される。

【0035】

本明細書の用語「機能的」とは、核酸配列が、列挙されたアッセイまたは目的に関して機能的であることを意味する。

【0036】

「モジュレーション活性」なる語句は、NS5AB関連活性または機能に影響する試験物質の能力をいう。かかる活性は性質としてアゴニスト性であってもよく、アンタゴニスト性であってもよい。対応する対照の存在下におけるRNA合成の増加を測定して、RdRp活性の増加によりアゴニスト性活性を測定してもよい。あるいは、RNA合成の減少により、アンタゴニスト性活性を測定しても

よい。ポリメラーゼ酵素活性をモジュレートする作用剤を評価するための種々のアッセイ方法が当業者に知られている。

【0037】

本明細書の「膜フラクション」なる語句は、生物学的な系に由来する慣用的な脂質含有膜フラクションまたは調合物、ならびに単離もしくは合成脂質または脂質成分、リポソーム、リポソーム処方およびミセル調合物のいずれかの組み合わせを包含する。

【0038】

語句「必須として含む」は、特定のヌクレオチドまたはアミノ酸に用いる場合、配列番号で示す配列の特性を有する配列を意味する。例えば、アミノ酸配列についていう場合、その語句はその配列自体およびその配列の基本的かつ新規な特徴に影響しない分子修飾体を包含する。

【0039】

「レプリコン」は遺伝学的エレメント、例えば、プラスミド、コスミド、バクミド、ファージまたはウイルスであって、それ自身の制御下でよく複製できるものである。レプリコンはRNAまたはDNAであってよく、1本鎖または2本鎖であってよい。

【0040】

「ベクター」はプラスミド、コスミド、バクミド、ファージまたはウイルスのごときレプリコンであり、別の遺伝学的配列またはエレメント（DNAまたはRNAいずれか）がそれに結合していて該結合配列またはエレメントの複製を引き起こすものであってもよい。

【0041】

「発現オペロン」とは、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル（例えば、ATGまたはAUGコドン）、ポリアダニル化シグナル、ターミネーター等のごとき転写および翻訳制御配列を有していてもよく、ポリペプチドをコードする配列の宿主細胞または生物中での発現を容易ならしめる核酸セグメントをいう。

【0042】

本明細書の用語「オリゴヌクレオチド」とは、本発明のプライマーおよびプローブをいい、2個またはそれ以上、好ましくは3個以上のリボ-またはデオキシリボ核酸から構成される核酸分子とし定義される。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは種々の因子およびオリゴヌクレオチドの個々の適用および用途に依存する。

【0043】

本明細書の用語「プローブ」は、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸をいい、RNAまたはDNAのいずれでもよく、例えば精製制限酵素消化物中に本来的に存在するものであっても、あるいは合成により製造されるものであってもよく、当該プローブに相補的な配列にアニールでき、あるいは特異的にハイブリダイゼーションできるものである。プローブは1本鎖または2本鎖であってよい。プローブの正確な長さは、温度、プローブ源および使用方法を包含する多くの因子に依存する。例えば、診断への適用に関しては、標的配列の複雑さに応じて、典型的にはオリゴヌクレオチドプローブは15～25個またはそれ以上のヌクレオチドを含有するが、より少ないヌクレオチドを含有していてもよい。本明細書でいうプローブは、特定の標的核酸配列の異なる鎖に対して「実質的に」相補的であるように選択される。このことは、1セットの前以て決定された条件下で対応する標的鎖に「特異的にハイブリダイゼーション」またはアニールするためにはプローブが十分に相補的でなければならないことを意味する。それゆえ、プローブ配列は標的の正確な相補配列を反映するものである必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチドフラグメントがプローブの5'または3'末端に結合していて、プローブ配列の残りの部分が標的鎖に相補的なものであってもよい。あるいはまた、非相補的塩基またはより長い配列がプローブ中に入っているもよいが、標的核酸配列に対して十分な相補性を有していて、プローブ配列が特異的にアニールすることが条件である。

【0044】

用語「特異的にハイブリダイゼーション」は、十分な相補性を有する2個の1本鎖核酸分子間の会合であって、当該分野において広く使用される前以て決定された条件下でのかかるハイブリダイゼーションを可能にする会合をいう（時々、

「実質的に相補的」という)。詳細には、該用語は、本発明の1本鎖DNAまたはRNA分子中に含まれる実質的に相補的な配列とオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションをいい、非相補的配列の1本鎖核酸とオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを実質的に排除する。

【0045】

本明細書の用語「プライマー」は、RNAまたはDNAであるオリゴヌクレオチドをいい、1本鎖または2本鎖であってよく、生物学的システムに由来するもの、制限酵素での消化により得られるもの、あるいは合成により製造されるもののいずれでであってもよく、正しい環境に置かれた場合に、鋳型に依存した核酸合成のイニシエーターとして機能的に作用しうるものである。適当な核酸鋳型、核酸の適当なヌクレオシド三リン酸前駆体、ポリメラーゼ酵素、適当なコファクターならびに適当な温度およびpHのごとき適当な条件とともに存在する場合、ポリメラーゼまたは類似の活性の作用によるヌクレオチド付加によって3'末端においてプライマーが伸長されて、プライマー伸長生成物が生じうる。プライマーは個々の条件および適用に関する必須因子に応じて様々な長さであってよい。例えば、診断への適用においては、典型的には、オリゴヌクレオチドプライマーは15～25個またはそれ以上のヌクレオチドの長さである。所望伸長生成物の合成を開始させるためには、すなわち、ポリメラーゼまたは類似の酵素による合成の開始に使用される適当に並置されたプライマーの3'ヒドロキシル部分を提供するに十分な様式で所望鋳型鎖とアニールできるためには、プライマーは、所望鋳型に対して十分に相補的でなくてはならない。プライマー配列が所望鋳型に正確な相補物である必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド配列が相補的プライマーの5'末端に結合していてもよい。あるいはまた、非相補的塩基がオリゴヌクレオチドプライマー配列中に入っているとしてもよいが、プライマー配列が所望鋳型鎖に対して十分な相補性を有し、伸長生成物の合成のための鋳型-プライマー複合体を機能的に提供することが条件となる。

【0046】

本明細書記載のアミノ酸残基は「L」異性体が好ましい。しかしながら、「D」異性体の残基がL-アミノ酸残基の代わりにあってもよいが、ポリペプチドの

所望特性が保持されることが条件である。本明細書に示されるすべてのアミノ酸残基配列は、右から左にアミノ末端からカルボキシ末端とする慣用的なものである。

【0047】

用語「単離蛋白」または「単離精製蛋白」を本明細書に時々使用する。この用語は、主として、本発明の単離核酸分子の発現により生成される蛋白をいう。あるいはまた、この用語は、本来的には関連している他の蛋白から十分に分離されて、「実質的に純粋」な形態で存在する蛋白をいう。「単離」は、他の成分または材料との人工的または合成的混合物を排除すること、あるいは基本的活性を妨害せず、例えば精製不十分、安定化剤添加、または例えば免疫原性調合物もしくは医薬上許容される調合物中への配合によって存在する可能性のある不純物の存在を意味するのではない。

【0048】

用語「実質的に純粋」は、少なくとも50～60重量%の物質（例えば、核酸、オリゴヌクレオチド、蛋白等）を含む調合物をいう。より好ましくは、調合物は少なくとも75重量%、最も好ましくは90～95重量%の化合物を含む。純度は、化合物に適した方法により測定される（例えば、クロマトグラフィー法、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC分析等）。

【0049】

「成熟蛋白」または「成熟ポリペプチド」は、ポリ蛋白前駆体からの蛋白分解プロセッシングのごとき発生の過程でポリペプチドに通常生じるプロセッシング後のポリペプチド配列を有するポリペプチドを意味する。「ポリ蛋白」または「前駆体」蛋白は成熟蛋白（複数も可）を含む蛋白であり、それは成熟後に成熟蛋白を生じる。成熟、ポリ蛋白または前駆体蛋白の配列または境界を命名する際に、蛋白配列の最初のアミノ酸をアミノ酸残基1と命名する。本明細書にて用いるように、成熟蛋白のアミノ酸1に先行する天然には見られないアミノ酸残基を-1、-2、-3などとする。組み換え発現系に関しては、メチオニン開始コドンがしばしば翻訳効率化の目的で使用される。よって、NS5Bの場合、メチオニンコドンをNS5AB蛋白配列のアミノ酸1に直接先行するように置いてもよい。

。得られたポリペプチド中のこのメチオニン残基は、本明細書によれば、成熟N S 5 A B 蛋白配列に対して - 1 の位置に置かれている。

【0050】

用語「タグ」、「タグ配列」または「蛋白タグ」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸、ペプチドもしくは蛋白または他の化学物質のいずれかである化学的部分をいい、別の配列に付加された場合、特に、該別の配列の検出または単離においてさらなる有用性を提供し、あるいは有用な特性を該別の配列に付与するものである。よって、例えば、ホモポリマー核酸配列または捕捉オリゴヌクレオチドに対して相補的な核酸配列をプライマーまたはプローブに付加して、その後行う伸長生成物またはハイブリダイゼーション生成物の単離を容易ならしめてもよい。蛋白タグの場合、ヒスチジン残基（例えば、4個ないし8個の連続したヒスチジン残基）を蛋白のアミノまたはカルボキシ末端に付加して、キレート金属クロマトグラフィーによる蛋白の単離を容易ならしめてもよい。別法として、特定の抗体分子または他の分子（例えば、フラッグエピトープ、c - m y c エピトープ、インフルエンザAウイルス赤血球凝集素蛋白の膜貫通エピトープ、セルロース結合ドメイン、カルモジュリン結合蛋白、マルトース結合蛋白、キチン結合ドメイン、グルタチオンS - トランスフェラーゼ等）と反応するエピトープまたは結合決定部位である、アミノ酸配列、ペプチド、蛋白または融合パートナーを蛋白に付加して、アフィニティーまたは免疫アフィニティークロマトグラフィーのごとき手順による蛋白の単離を容易ならしめてもよい。化学タグ部分は、核酸または蛋白のいずれかに付加でき、アビジン試薬との相互作用により単離または検出を容易ならしめることのできるビオチンのごとき分子等を包含する。他の多くのタグ部分が当業者に知られ、考えられており、それらはこの定義の範囲内である。

【0051】

本明細書の用語「リポーター」、「リポーターシステム」、「リポーター遺伝子」、または「リポーター遺伝子産物」は作動性の遺伝子システムを意味し、該システム中において、核酸は、例えば生物学的アッセイ、イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、または比色法、蛍光法、化学発光法または他の方法により容

易に測定できるリポーターシグナルを発現の際に生じる遺伝子産物をコードしている遺伝子を含んでいる。核酸はRNAまたはDNAであってよく、直鎖状または環状であってよく、1本鎖または2本鎖であってよく、アンチセンスまたはセンス鎖であってよく、リポーター遺伝子産物の発現に必要な制御エレメントに作動可能に連結されている。必要な制御エレメントは、リポーターシステムの性質およびリポーター遺伝子がDNA形態かRNA形態かにより様々であるが、プロモーター、エンハンサー、翻訳制御配列、ポリA付加シグナル、転写終結シグナル等のごときエレメント（これらに限らない）を包含しうる。

【0052】

用語「形質転換」、「トランスフェクト」、「ドランスダクション」は、核酸を細胞または宿主生物中に導入する方法または手段をいい、同じ意味を表すために混用することがある。かかる方法は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、PEG-融合等を包含するが、これらに限らない。

【0053】

導入された核酸は受容細胞または生物の核酸中に組み込まれ（共有結合し）てもよく、組み込まれなくてもよい。細菌、酵母、植物および哺乳動物細胞において、例えば、導入された核酸は、プラスミドのごときエピソードエレメントまたは独立したレプリコンであってもよい。あるいはまた、導入された核酸は受容細胞または生物の核酸中に組み込まれるようになり、当該細胞または生物中で安定に維持され、さらに継代され、あるいは受容細胞または生物の子孫細胞または生物に遺伝されるものであってもよい。他の様式において、導入された核酸は受容細胞または生物中に一時的にのみ存在するものであってもよい。

【0054】

「クローン」または「クローン細胞集団」は、単一細胞または共通の祖先から有糸分裂により派生する細胞集団である。

【0055】

「細胞系」は、インビトロにおいて多くの世代にわたり安定に増殖しうる一次細胞のクローンまたは細胞集団である。

【0056】

「免疫応答」は、機能的な免疫系を有する宿主においてウイルス抗原のごとき抗原により引き起こされる反応を意味する。免疫応答は、その性質において体液性、すなわち免疫グロブリンまたは抗体の産生を含むもの、あるいはその性質において細胞性、すなわち種々のタイプのBおよびTリンパ球、樹状細胞、マクロファージ、抗原提示細胞等を含むもの、あるいはそれらの両方であってよい。免疫応答は、サイトカイン、リンホカイン等のごとき種々のエフェクター分子の産生または生成を含むものであってもよい。インビトロおよび種々の細胞または動物系の両方において免疫応答を測定することができる。かかる免疫応答は宿主を疾病から防御することにおいて重要である可能性があり、予防的および治療的に用いることができる。

【0057】

「ウイルス抗原」は、宿主の機能的免疫系の反応を起こさせる潜在能力を有するウイルス由来のペプチド、ポリペプチドまたは蛋白配列、セグメントまたはエピトープである。

【0058】

「抗体」または「抗体分子」は、特異的抗原に結合する、抗体およびそのフラグメントを包含する免疫グロブリンである。該用語はポリクローナル、モノクローナル、キメラ、および二特異性抗体を包含する。本明細書において使用するよう、抗体または抗体分子は両方とも無傷の免疫グロブリン分子ならびにF a b、F a b'、F (a b')²およびF (v)として当該分野で知られた免疫グロブリン分子の部分のごとき免疫学的に活性のある免疫グロブリンの分子の部分を包含する。

【0059】

本明細書の用語「生きた宿主」はヒトでない自立性存在を意味する。

【0060】

発明の詳細な説明

本発明は、NS5ABをコードする核酸を含むペスチウイルスおよびヘパチウイルスの遺伝学的材料を提供する。さらに本発明は、これらの核酸配列から発現

されるペスチウイルスおよびヘパチウイルスの組み換えNS5AB蛋白、さらにはRdRp活性を有するNS5AB配列を提供する。最後に、NS5AB配列および蛋白の使用方法が提供される。

【0061】

ペスチウイルスおよびヘパチウイルスの組み換えNS5AB遺伝子配列の発現を、無細胞系、細菌、酵母、哺乳動物、昆虫および植物細胞系（これらに限らない）を包含する種々の系、ならびに感染、トランスフェクション、トランスダクションされた、あるいはトランスジェニックな昆虫、動物または植物において行うことができる。プラスミドDNAからのRNA転写を可能にする無細胞転写-翻訳ベクターが構築されている。その後のかかるRNA転写物の無細胞翻訳を用いてペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5AB蛋白を製造する。

【0062】

好ましい具体例において、細胞培養物における感染後に昆虫細胞においてNS5AB蛋白の発現を可能にするNS5AB配列を含有する組み換えバキュロウイルスが構築される。

【0063】

NS5AB蛋白が発現され、精製される。これらの精製蛋白は、ペスチウイルスおよびヘパチウイルス感染ならびに関連疾患の予防または治療において有効でありうる抗ウイルス剤のスクリーニングにおいて有用なRdRp活性を有する。

【0064】

そのようにして製造されたペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5AB蛋白を、変化した機能性を有するNS5AB蛋白を生じさせるヌクレオチドおよびアミノ酸配列の特定の変化により修飾してもよい。かかる変化は微妙なものであってもよく、ヌクレオチド配列の場合のごとき代表的な保存的置換であってもよく、コードされるアミノ酸を変化させる、あるいはさせないコドン配列における変化であってもよく、アミノ酸配列に関して、保存的残基置換、付加または欠失を生じさせる変化であってもよい。

【0065】

最後に、例えば、NS5AB蛋白のNS5AおよびNS5Bへの正常な蛋白分

解プロセッシングが起こらない感染性ウイルスゲノムにより、NS5A B蛋白を発現させてもよい。このプロセッシングの妨害はNS5A Bをプロセッシングされず、インタクト (intact) のままにする。このNS5A Bの開裂の妨害は、例えば、アミノ酸残基の修飾、あるいはNS5A - NS5Bジャンクションにおける開裂に必要な蛋白中の決定基の修飾により、多くの方法またはアプローチによって行われうる。別法として、当業者に知られた種々の方法により、この開裂に間よする蛋白分解活性の排除、除去または不活性化を行ってもよい。

【0066】

ペスチウイルスおよびヘパチウイルスのSN5A B核酸分子およびNS5A B蛋白の製造ならびにアッセイ方法およびキットにおけるそれらの使用

A. 核酸分子

本発明のペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5A B蛋白をコードする核酸分子を、2つの一般的方法により製造することができる：(1) 適当な化学出発物質からそれらを合成してもよく、あるいは(2) 生物学的ソースからそれらを単離してもよい。両方の方法は当該分野においてよく知られたプロトコルを用いるものである。

【0067】

NS5A B配列に関して本明細書に提供されるようなヌクレオチド配列情報の利用可能性は、オリゴヌクレオチド合成による本発明の単離核酸分子の製造を可能にする。Applied Biosystems 38A DNA合成装置または類似の装置において用いられるホスホラミダイト法により合成オリゴヌクレオチドを製造してもよい。高品質液体クロマトグラフィー (HPLC) のごとき当該分野において知られた方法により、得られた構築物を精製してもよい。現行のオリゴヌクレオチド合成法に固有のサイズ制限のため、本発明のDNA分子のごとき長い二本鎖ポリヌクレオチドをいくつかの段階において合成しなければならない。かくして、例えば、3キロベースの二本鎖分子を、適切な相補性のある数個のより小さなセグメントとして合成してもよい。かくして得られた相補的セグメントを連結して、各セグメントが隣接セグメントの接着のための適切な付着末端を持つようにする。DNAリガーゼの存在下において付着末端をアニーリングすることにより隣接セ

グメントを連結して、3キロベースの二本鎖分子を構築してもよい。次いで、そのようにして構築された合成DNA分子を適当なベクター中にクローニングし、増幅してもよい。

【0068】

当該分野において知られた方法を用いてNS5AB蛋白をコードする核酸配列を適切な生物学的ソースから単離してもよい。例えば、細胞培養物中で増殖したBVDVから、あるいはHCV感染患者の血清から単離されたRNAを、それぞれペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5AB蛋白をコードするcDNA分子を得るための適当な出発材料として用いてもよい。

【0069】

本発明によれば、適切なストリンジェンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を用いることにより、本発明のDNA分子の蛋白コーディング領域に対して適切なレベルの配列相同性を有する核酸を同定してもよい。例えば、5X SSC、5X Denhardt's試薬、1.0% SDS、100 μg/mlの変性されせん断されたサケ精子DNA、0.05%ピロリン酸ナトリウムバッファーおよび50%までのホルムアミドを含有するハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイゼーションを行ってもよい。37~42℃で少なくとも6時間ハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーション後、以下のようにフィルターを洗浄する：(1) 2X SSCおよび1% SDS中、室温で5分；(2) 2X SSCおよび0.1% SDS中、室温で15分；(3) 1X SSCおよび1% SDS中、37℃で30分~1時間；(4) 1X SSCおよび1% SDS中、42~65℃で2時間(30分ごとに溶液を交換)。

【0070】

特定の配列相同性の核酸分子間のハイブリダイゼーションを達成するために必要なストリンジェンシー条件を計算するための1の一般的な式は以下のものである(Sambrook et al., 1989)：

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\% G + C) - 0.63 (\% \text{ホルムアミド}) - 600 / \text{二本鎖塩基対数}$$

【0071】

上式の説明として、 $[Na^+] = [0.368]$ および50%ホルムアミド、GC含量42%、および平均プローブサイズ200塩基とすれば、 T_m は57である。DNA二本鎖の T_m は、相同性が1%低下するごとに1~1.5 低下する。かくして、約75%の配列同一性よりも高い同一性の標的は、42 のハイブリダイゼーション温度を用いて観察されるであろう。かかる配列は、本発明の配列と実質的に相同的であるとみなされる。

【0072】

いずれかの便利なクローニングベクター中のDNAとして本発明の核酸を維持してもよい。1の具体例において、pBlue script プラスミド (Stratagene, La Jolla, CA) のごときプラスミドクローニング/発現ベクター中、あるいは適当なE. coli宿主細胞中で増殖するpFast Bacベクター (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) のごときバキュロウイルストランスファーベクター中にクローンを維持してもよい。

【0073】

部位特異的突然変異誘発法 (これに限らない) を包含する当該分野においてよく知られた多くの合成的および分子生物学的方法を用いて、本発明の核酸を本発明の核酸の配列変種を得るための出発材料として使用してもよい。特別な変異は、酵素活性の増大のごとき変化した特性を有するNS5AB蛋白を生じさせる。

【0074】

本発明のNS5AB蛋白をコードする核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA、RNA、およびそれらのフラグメントを包含し、それらはその性質上1本鎖または2本鎖であってよい。かくして、本発明は、本発明の核酸分子の少なくとも1の配列とハイブリダイゼーションしうる配列を有するオリゴヌクレオチド (DNAまたはRNAのセンスまたはアンチセンス鎖)、例えば、本発明において同定されるいずれかの配列を実質的に有するcDNAの選択されたセグメントを提供する。さらにかかるオリゴヌクレオチドは、NS5ABをコードするさらなる核酸を検出または単離するためのプローブおよびプライマーとして有用である。

【0075】

B. 蛋白

NS5AB蛋白をコードする核酸分子の利用可能性は、当該分野において知られたインビトロ発現法を用いる蛋白の製造を可能にする。例えば、cDNAまたは遺伝子を、インビトロ転写用のpSP64またはpSP65のごとき適当なインビトロ転写ベクター中にクローニングし、次いで、小麦胚芽またはウサギ網状赤血球のごとき適当な無細胞翻訳系、あるいは例えばHeLa細胞由来のもののごとき他の哺乳動物細胞抽出物またはフラクションにおいて無細胞翻訳を行ってもよい。例えば、Promega Biotech, Madison, WisconsinまたはGibco-BRL, Rockville, Marylandから、いくつかのインビトロ転写および翻訳系が市販されている。

【0076】

別法として、適当な原核または真核系における発現により、より大量のNS5AB蛋白を得てもよい。例えば、本発明において同定された配列を有するcDNAのごときDNA分子の一部または全部を、E. coliのごとき細菌細胞中での発現に適合したプラスミドベクター、あるいは昆虫細胞中での発現用のバキュロウイルスベクター中に挿入してもよい。かかるベクターは、宿主細胞（例えば、E. coliまたは昆虫細胞）中でDNAの発現を可能にするような様式で並んでいるDNAの発現に必要な調節エレメントを含む。発現に必要なかかる調節エレメントは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列および翻訳制御配列（これらに限らない）を包含する。

【0077】

組み換え無細胞、原核または真核系における遺伝子発現により製造されるNS5AB蛋白またはその誘導体を、当該分野においてよく知られた多くの方法のいずれかにより製造し、豊富化し、あるいは精製してもよい。例えば、本発明のNS5AB蛋白を適当なソース、例えば、無細胞系、細菌、動物、昆虫または植物の培養細胞または組織から、細胞フラクショネーション、パーティショニング、逆ミセルパーティショニング、水性二相分配抽出、沈殿法、クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、キレーションクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、免疫アフィニティークロマトグラフィー、高圧液体

クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、遠心分離、膜濾過、ゲル濾過、免疫沈降法、電気泳動、等電点フォーカシング、等速電気泳動等を包含しうる種々の方法により、精製してもよい。

【0078】

1の具体例において、市販の発現／分泌系を用いることができ、それにより、組み換え蛋白が発現され、その後、宿主細胞から分泌され、周囲の培地から容易に精製される。かかる分泌系または他の発現系を用いて、組み換え蛋白に特異的に結合する抗体との免疫学的相互作用、あるいはN末端またはC末端に4～8個のヒスチジン残基のタグを付けた組み換え蛋白を単離するためのニッケルカラムのごときアフィニティー分離により組み換え蛋白を精製してもよい。かかる方法は当業者により通常に用いられている。

【0079】

上記方法により製造される本発明のNS5AB蛋白を標準的方法により分析してもよい。例えば、かかる蛋白を電気泳動分析およびアミノ酸配列分析、ならびに知られた方法による構造決定のための結晶回折像分析に付してもよい。

【0080】

C. アッセイ方法およびキット

本発明のさらなる態様において、本発明の配列に由来するNS5AB核酸およびポリペプチドは、研究、診断、治療および医薬への適用を包含する多くの方法、アッセイおよびキットにおいて、ならびにペスチウイルスおよびヘパチウイルス疾患の予防および治療のための抗ウイルス戦略の開発において有用である。

【0081】

本発明の核酸配列、およびこれらに相補的な配列を、生物学的または合成調合物中の関連核酸の検出、標識、同定または単離のためのプローブまたはプライマーとして用いてもよい。例えば、本発明の核酸配列をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、試料中のペスチウイルスまたはヘパチウイルスの存在を検出してもよい。さらに、かかるハイブリダイゼーションプローブを用いて、当該分野においてよく知られた方法によりそれらがハイブリダイゼーションする核酸を単離してもよい。さらに、本発明の核酸配列を、逆転写酵素 - ポリメラーゼ連

鎖反応 (RT-PCR) のごとき方法を用いるベスチウイルス、ヘパチウイルスまたは関連核酸の検出または単離のためのプライマーとして用いてもよい。さらに、適当なプライマーペアを入れ子PCRに適用してもよい。かかるプライマー、プライマーペアおよびプローブは本発明のNS5AB配列のいずれの部分であってもよい。使用されるNS5AB遺伝子の実際の配列は個々の適用に応じて様々であろう。そのうえ、ホモポリマーテイル(タグ)、有用な制限酵素認識部位である配列、特定のアミノ酸残基をコードする配列、開始および終結コドン、または特別な適用に有用でありうる他の配列のごときさらなる配列を、プライマーまたはプローブ配列に付加してもよい。典型的には、本発明の配列と同じまたは相補的な長さ10ないし80ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションプローブまたはRT-PCR用のプライマーとして有用である。別法として、NS5AB配列全体を、例えば、キャプチャーハイブリダイゼーションプローブとして使用してもよい。

【0082】

さらに、本発明の核酸配列を、部位特異的突然変異誘発法を包含する当該分野において知られた種々の方法論を用いる本発明の配列の変種または変異体を得るためのプライマーとして用いてもよい。

【0083】

もう1つの態様において、本発明の核酸配列を、感染性ウイルス、ベクターまたはレプリコンの構築または生成に使用してもよく、あるいはそれらの中への取り込みに使用してもよい。ほとんど機能のない、あるいは無機能なカウンターパートへの本発明の機能的なNS5AB配列の提供あるいは該カウンターパートの本発明の機能的NS5AB配列での置換は、得られるウイルスまたは複製ユニットの感染および複製特性の改善に役立つ可能性がある。当該分野においてよく知られた標準的な遺伝子工学的的方法により、かかる置換を行ってもよい。得られる感染性核酸は、改善されあるいは高レベルのウイルスRNA合成、改善された感染性ウイルス産生レベル、および生きた宿主およびインビトロ系における改善されたウイルス複製(これらに限らない)において、現行の感染性クローンよりもかなり有利であろう。相補系またはトランス相補系、レプリコン系、欠陥ウイ

ルス、欠陥干渉粒子等のごときポスチウイルスまたはヘパチウイルスのNS5ABの機能が重要である他の系における使用もまた、本発明の核酸配列の使用から利益を得るであろう。

【0084】

もう1つの具体例において、本発明の核酸配列を、NS5AB蛋白に対する免疫応答を誘発する方法に使用してもよい。例えば、発現オペロンに作動可能に連結された本発明のNS5ABをコードする核酸配列を生きた宿主または機能している免疫系を有するヒトの細胞中に、特に、樹状細胞のごとき抗原提示細胞中に直接導入してもよい。配列の導入には、トランスフェクション、形質転換、またはトランスダクション法を用いてもよく、プラスミド被覆金粒子のごときNS5AB核酸配列で被覆された粒子の物理的取り込みを用いてもよい。いったん細胞に入ると、NS5AB配列が発現され、プロセッシングされ、宿主の免疫系に提示される。かかる方法は、生きた宿主およびヒトにおける体液性および細胞性免疫応答の誘発において、ならびにペスチウイルスおよびヘパチウイルス感染および疾患用のワクチンにおいて有用である。

【0085】

NS5AB配列の転写および/または翻訳を可能にする無細胞系において本発明の核酸配列を用いてもよい。例えば、転写プロモーター配列に連結されたNS5AB DNAをインビトロで転写させてNS5AB RNA分子を製造してもよい。次いで、網状赤血球、小麦胚芽、HeLa細胞または他の細胞タイプのごときRNAの転写に適した成分が提供された場合に、かかるRNA分子はNS5ABポリペプチドに翻訳される。次いで、翻訳されたNS5AB蛋白を用いて、かかる無細胞系においてそのRdRp活性のごときその活性を測定してもよい。かかる無細胞系は、ペスチウイルスまたはヘパチウイルスに対するアンタゴニストまたはアゴニスト活性を包含する活性をモジュレートするための試験物質のアッセイ方法において有用である。NS5AB RdRp活性、およびかかる作用剤のNS5ABに対するモジュレート効果を、多くの方法で測定することができる。例えば、NS5ABポリメラーゼ活性に直接または間接的に依存しているRNA合成を定量してもよい。1のやり方において、NS5AB RdRpのRNA

基質の生成物RNAへの変換を、例えば、ゲル電気泳動により測定してもよい。別法として、NS5AB活性に依存するトリクロロ酢酸沈殿可能RNA中に取り込まれる放射性標識RNA前駆体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{33}P - または ^{33}P - ヌクレオシド三リン酸）の量を測定してもよい。

【0086】

さらに本発明の核酸配列を、NS5AB蛋白を発現する細胞系または細胞システムを得ることに用いてもよい。本発明のNS5AB遺伝子からNS5AB蛋白が発現されるかかる細胞系は、ペスチウイルスまたはヘパチウイルスに対するアンタゴニストまたはアゴニスト活性をアッセイする方法において有用であろう。例えば、本発明のNS5AB蛋白を発現するインタクトな細胞がNS5AB蛋白の細胞内活性に影響する可能性のある作用剤または物質と接触させられ、NS5ABに対するかかる作用剤の効果が下記のごとく測定されるアッセイを確立してもよい。

【0087】

別法として、かかる細胞システムは、レポーターシグナルの発生がNS5AB RdRpによるRNA合成に依存するレポーターシステムを用いるものであってもよい。1の具体例において、センス鎖（mRNA）が有効に翻訳されて検出可能なポリペプチドを生じるか、あるいは検出可能なシグナル（レポーター）を発生させうるものである、そのmRNAのアンチセンス鎖であるNS5ABポリメラーゼのRNA基質が提供される。例えば、ルシフェラーゼのコーディング配列に相補的な配列を含むRNA分子（アンチセンス鎖）が提供される。このRNAに対するNS5ABポリメラーゼの活性は、ルシフェラーゼ遺伝子のセンス鎖を生じさせ、次いで、細胞の翻訳系により翻訳されてルシフェラーゼ蛋白が生じる。次いで、ルシフェラーゼ蛋白に対する抗体により、あるいはルミノメーターまたは他の類似の装置を用いてインタクトな細胞または細胞抽出物中のルシフェラーゼ活性を測定することにより、ルシフェラーゼ蛋白を検出してもよい。 β -ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、蛍光緑色蛋白等（これらに限らない）を包含する多くの他のレポーターがこの用途に同様に十分に役立ちうる。さらにそのうえ、本発明のこの方法に使用されうる細胞系は細菌、真菌、昆虫、

鳥類、哺乳動物または植物起源のものであってもよい。

【0088】

さらに、NS5AB核酸配列と相互作用または影響しうる作用剤または物質を同定するためのアッセイにおいて本発明の核酸配列を用いてもよい。例えば、本発明の核酸配列が用意され、次いで、かかる配列と相互作用する可能性のある作用剤または物質と接触させられるアッセイを確立してもよい。かかる相互作用アッセイにおいて同定された作用剤は潜在的な診断用途を有し、例えば生物学的試料中のペスチウイルスまたはヘパチウイルスの検出に使用されうる。かかる作用剤は、ヒトを包含する罹病した生きた宿主におけるペスチウイルスおよびヘパチウイルス疾患の予防または治療を包含する用途において、ならびに生きた宿主および細胞、組織および器官培養物のごときインビトロ系におけるペスチウイルスまたはヘパチウイルスの複製または増殖を阻害または促進するためにも潜在的に有用であろう。個々の作用剤の性質が明らかになったならば、さらなる用途が考えられうる。

【0089】

本発明のペスチウイルスおよびヘパチウイルスのNS5AB蛋白の組成物もまた広範な用途がある。診断用途において、例えば、NS5AB蛋白またはそのペプチドを、それらに対する免疫応答を検出するためのアッセイに使用してもよい。例えば、本発明の蛋白配列またはペプチドを、それらの配列がマトリックス上に固定化され、それらの配列に指向された抗体を捕捉するために使用されるアッセイに用いられてもよい。さらに、本発明の蛋白配列またはペプチドを用いて、免疫細胞増殖アッセイのように、細胞により媒介される蛋白に対する免疫応答を検出または測定してもよい。

【0090】

本発明のNS5AB蛋白の組成物は、ワクチン中のごとき免疫応答の誘発においても有用である。例えば、本発明のNS5AB蛋白またはそのペプチドを、機能的免疫系を有する生きた生物に提供することは、かかる生物にNS5AB配列に対する免疫応答を生じさせるであろう。当業者によく知られた多くの方法でNS5AB配列を生きた生物に提供することができ、それらの方法は、遊離蛋白ま

たはペプチドを提供すること、処方された蛋白またはペプチドを提供すること、蛋白 - アジュバント抱合体またはペプチドを提供すること、あるいはNS5AB配列が存在するインタクトまたは破壊された細胞の文脈において蛋白またはペプチドを提供すること、ならびに他のかかる方法を包含するが、これらに限らない。そのようにして誘発された免疫応答は性質上体液性または細胞性であってよく、あるいは両方であってもよい。かかる免疫応答は、生きた宿主を疾病から防御することにおいて重要であり得、また、抗体のごとき有用な免疫学的試薬のソースを提供しあるいはソースとして役立つ可能性があり、さらにそれらは治療上または診断上有用でありうる。さらに本発明のNS5AB蛋白またはそのペプチドを用いて、NS5ABに対するかかる抗体を選択または精製してもよい。例えば、NS5AB蛋白を固定化し、これを用いてNS5AB蛋白に特異的な抗体を結合させ、かくして、かかる抗体を豊富化させてもよい。さらにそのうえ、当業者に知られた標準的方法を用いてNS5AB蛋白に対するモノクローナル抗体を得るために本発明のNS5AB蛋白およびペプチドを用いてもよい。NS5AB蛋白に対する抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、NS5AB RdRp活性の酵素活性に影響するそれらの能力についてさらに評価されてもよい。

【0091】

本発明のNS5AB蛋白の組成物は、NS5AB蛋白と相互作用または影響しうる作用剤を検出および同定するためのアッセイにおいて有用である。本発明のNS5ABポリペプチド配列が用意され、次いで、かかる配列と相互作用する可能性のある作用剤または物質と接触させられるアッセイを確立してもよい。例えば、本発明のNS5AB蛋白またはそのフラグメントもしくは部分が提供されると、接触させられた作用剤が該蛋白に特異的に結合する能力に関してアッセイされうる。次いで、かかる結合作用剤は潜在的な診断有用性があり、例えば、生物学的試料中のペスチウイルスまたはヘパチウイルスの検出において有用でありうる。かかる結合作用剤はさらに、NS5AB蛋白の機能的活性に影響する可能性があり、例えば、NS5AB機能を阻害または促進しうる。NS5AB蛋白の機能を阻害する作用剤は、罹病した生きた宿主におけるペスチウイルスまたはヘパ

チウイルス疾患の予防または治療、あるいはヒトを包含する生きた宿主、細胞、組織および器官培養物のごときインビトロ系、または生物学的材料におけるウイルスの複製または増殖の阻害を包含する用途において潜在的に有用であろう。NS5AB蛋白の機能を促進させる作用剤は、ウイルス複製に関する動物モデルのごとき生きた宿主におけるペスチウイルスまたはヘパチウイルスの複製、増殖または産生を包含する用途において、ならびに細胞、組織および器官培養物のごときインビトロ系において潜在的に有用であろう。

【0092】

もう1つの具体例において、本発明のNS5AB蛋白の酵素活性により提供されるNS5ABポリメラーゼ活性を直接測定するアッセイの方法が提供される。該酵素的に活性のあるNS5ABポリメラーゼと接触させられた作用剤を、この酵素活性を特異的にモジュレートするそれらの活性に関してアッセイすることができる。かかる酵素的に活性のあるポリメラーゼは、該ポリペプチドが産生された細胞の抽出物または溶解物中に、インビトロ無細胞発現系に、あるいは豊富化または精製された形態として提供されうる。

【0093】

抽出物中に、無細胞系に、あるいは豊富化された形態で提供されたNS5AB蛋白の酵素活性を評価できる多くの手段が存在し、当該分野においてよく知られている。典型的には、NS5AB-依存性RNA合成は、最小限に緩衝化された培地、2価カチオン、RNA前駆体（ヌクレオシド三リン酸、NTPs）およびRNA鋳型または基質を包含する特定の反応成分を必要とする。反応条件の性質に応じて、そしてこれらの条件がプライマー-依存性RNA合成を可能にするものであるかどうか、あるいはこれらの条件がプライマーに依存するものであるかどうかにより、RNA合成用プライマーが含まれてもよく、含まなくてもよい。さらなる成分は、1価カチオン、還元剤、安定化剤、コファクター、ならびにRNase、ホスファターゼ、キナーゼ、ホスホトランスフェラーゼおよび類似の活性に対する阻害剤のごときNS5AB RdRp活性に無関係な活性に対する阻害剤を包含しうる。

【0094】

NS5AB蛋白の活性を測定するために、多くの活性検出および測定方法を用いることができ、それらの方法は、電気泳動、放射線測定、比色、蛍光を発するもの、あるいは化学発光するもの（これらに限らない）を包含し、いずれかがNS5AB RdRp活性の場合に適する。1の様式において、NS5AB RdRpのRNA基質から生成物RNAへの変換を、例えば、ゲル電気泳動により測定してもよい。別法として、RNA前駆体のRNAポリマー中への取り込み、例えば、放射性標識NTPのトリクロロ酢酸沈殿可能RNA中への取り込みを測定し、次いで、シンチレーションスペクトル測定または燐光イメージング法により定量してもよい。別法として、検出を容易ならしめる他の部分、例えば種々のアビジン抱合体を包含するアビジン試薬で検出するためのビオチン、またはアルカリホスファターゼ等、あるいは蛍光分極のごとき蛍光法を用いる検出用の蛍光標識NTPsを、かかる前駆体にタグとして付してもよい。

【0095】

鋳型RNA分子上でのRNA合成を開始させるためのポリメラーゼにより用いられる放射性標識またはビオチンタグ付きオリゴヌクレオチドのごときRNA合成の標識またはタグ付きプライマーの伸長を測定することにより、NS5AB-依存性RNA合成を評価してもよい。プライマーへのヌクレオチド三リン酸の付加を定量することにより、プライマー生成物の長さを決定することにより、あるいは当該分野で知られた他の方法により、プライマーの伸長を評価してもよい。

【0096】

別法として、ハイブリダイゼーション法を用いる生成物RNAの捕捉により、NS5AB RdRp活性の生成物を検出し定量してもよい。例えば、NS5AB RdRp反応の生成物に相補的なオリゴヌクレオチドを反応中または反応後に導入し、生成物とハイブリダイゼーションさせてもよい。添加されたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの程度を混合物中に存在する生成物RNA量の尺度として使用してもよく、当該分野において知られた種々の手段により評価することができる。

【0097】

NS5AB RdRp活性による生成物の他の検出手段は、当業者に容易に知

られ、あるいは思い付くことのできるものであり、ここで十分に企図される。

【0098】

本発明の核酸およびポリペプチドの組成物を用いるアッセイを、多くの形式にフォーマットすることができる。多くの作用剤および材料を評価するのに特に有用なのは高処理量スクリーニングフォーマットである。伝統的には、かかるフォーマットは96ウェルプレート中にフォーマットされるのが典型であった。しかしながら、384、864および1536ウェルプレートをかかる高処理量アッセイ系に使用することができる。これらの系はしばしばロボット工学を用いて自動化されて、多数の試料の取り扱いおよび処理が可能となっている。

【0099】

潜在的なアンタゴニストまたはアゴニスト効果に関して本発明の種々のアッセイ方法において評価されうる作用剤または物質は、小型分子、ポリマー、ペプチド、ポリペプチド、蛋白、免疫グロブリンまたはそれらのフラグメント、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、ペプチド-核酸抱合体、リボザイム、ポリヌクレオチド等を包含するが、これらに限らない。

【0100】

本発明の組成物およびアッセイ方法を用いて同定される作用剤または材料の潜在的有用性は広範であり、ペスチウイルスおよびヘパチウイルスの核酸およびポリペプチドの検出および単離、ペスチウイルスまたはヘパチウイルス感染の検出または診断、ヒトを包含する罹病した生きた宿主におけるペスチウイルスまたはヘパチウイルス疾患の予防および治療、および生きた宿主および細胞、組織および器官培養物のごときインビトロ系におけるペスチウイルスまたはヘパチウイルスの複製または増殖の阻害または促進のための用途、ならびに作用剤の性質が明らかになった場合に考えられうる他の用途を包含するであろう。

【0101】

本発明のもう1つの特徴は、本明細書に開示した組成物および方法の使用を容易ならしめるためのキットを包含する。典型的なキットは、本発明のNS5AB核酸およびポリペプチド、および/またはそれらの変種を、単独で、あるいは適当なベクターとともに含むであろう。個々の適用に関する本発明の組成物の使用

プロトコルおよび適用する際に必要な試薬も含まれるであろう。かかる試薬は、バッファー、溶媒、培地および溶液、基質およびコファクター、ベクターおよび宿主細胞、ならびに検出またはレポーター試薬を包含しうるが、これらに限らない。アクセサリー品としてはバイアル、容器、反応チャンバおよび説明書が挙げられる。

【0102】

下記実施例は本発明をさらに詳細に説明するために提供される。これらの実施例は本発明の実施のために目下考えられる好ましいモードを示すものであり、本発明を説明するものであって、本発明を限定するものではない。

【0103】

実施例1

転写 - 翻訳ベクター中のBV DV NS5 BおよびNS5 ABのクローニングおよび発現

感染性クローンの文脈において機能的であることが示されている (Vassilev et al. (1997) J. Virol. 71: 471-478およびMendez et al. (1998) J. Virol. 72: 4737-4745) 完全長クローン (Genbank受託番号M31182) の一部分を含むプラスミド pBVSD2-3 (Wiskerchen and Collett (1991) Virology 184: 341-350) を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、プロトタイプのペスチウイルス (BV DV-1、NADL株) のNS5 BおよびNS5 AB配列を得た。5' プライマーは、Sma I 制限酵素部位、翻訳開始のためのATGコドン、それに続く公表されたBV DV NADL配列 (Collett et al. (1988) J. Virol. 165: 191-199) のヌクレオチド8705 ~ 8738 (NS5 Bプライマー) および10197 ~ 10216 (NS5 ABプライマー) に対応する配列を含んでいた。NS5 BおよびNS5 AB蛋白のN末端は、Xuらにより報告されたデータ (J. Virol. 71: 5312-5322, 1997) に基づいていた。3' プライマーは両方の増幅に関して同じであり、ポリ蛋白コーディング領域の停止コドン、それに続くCla I 制限酵素部位を含むヌクレオチド12330 ~ 12354に相補的な配列を含んでいた。

【0104】

P C R反応系は100 ngのDNA鋳型、200 μ MのdNTPs、200ピコモルの各プライマー、2ユニットのvent DNAポリメラーゼ (New England Biolabs) を含んでいた。P C R反応系は下記のものを30サイクル行った: 94

で90秒、55 で45秒、次いで72 で2分 (NS5B) または4分 (NS5AB)。サイクリング後、反応物を72 で10分インキュベーションした。

【0105】

P C R増幅フラグメントをプラスミドD J B 2中に連結した。プラスミドD J B 2は、T7 RNAポリメラーゼプロモーターの下流に存在する完全な1型ポリオウイルスゲノム配列を含んでいるプラスミドpT7-PV1(A)₈₀ (Sarnow (1989) J. Virol. 63: 467-470) の誘導体である。D J B 2は、ポリオウイルス3Dコーディング配列の3'部分に融合した機能的なポリオウイルスの内部リボソームエンタリー部位 (IRES) を含むポリオウイルスの5' NTR、3' NTRおよびポリ(A)₈₀テイルからなる。P C R増幅されたNS5BおよびNS5AB遺伝子フラグメントをMscIで切断されたD J B 2中に連結し、次いで、E. coli SURE細胞 (Stratagene) 中に形質転換した。制限フラグメント消化パターンにより正しい方向にインサートを有するプラスミドを形質転換体から同定し、D J B 2-BVDV-NS5BおよびD J B 2-BVDV-NS5ABと命名した。これらの形質転換ベクター構築物は、AUGコドン上流のポリオウイルスIRES、それに続く (イン・フェーズ (in phase) で) 挿入遺伝子の蛋白コーディング配列および翻訳終止コドンを含んでいた。プラスミドD J B 2-BVDV-NS5AB中のNS5ABのDNA配列を配列番号: 1として同定し、その推定アミノ酸配列を配列番号: 2として同定する。

【0106】

記載されたように (Barton et al. (1996) Methods in Enzymol. 275: 35-57) T7ポリメラーゼを用いてMluIでの切断により前もって直鎖状にされたプラスミドD J B 2-BVDV-NS5BおよびD J B 2-BVDB-NS5ABからRNA転写物を調製した。RNA転写物をフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール抽出し、エタノール沈殿させ、セファデックス-G50クロマ

トグラフィーにより精製した。

【0107】

RNA転写物からのNS5BおよびNS5AB蛋白の発現を、Barton et al. (1996)により記載されたようにHeLa S10翻訳系において行った。反応混合物(最終体積50 μ L)は25 μ LのHeLa S10抽出物、10 μ LのHeLa開始因子、5 μ Lの10Xヌクレオチド反応混合物(10 mM ATP、2.5 mM UTP、2.5 mM GTP)、600 mMの酢酸カリウム、300 mMのリン酸クレアチン、4 mg/mLのクレアチンキナーゼ、155 mMのHepes-KOH (pH 7.4)および50 μ g/mLのRNA転写物を含んでいた。いくつかの場合において、反応系は、新たに合成された蛋白を放射性標識するために[35 S]-メチオニンを含んでいた。反応混合物を30℃で2時間インキュベーションした。

【0108】

翻訳反応において合成されたポリペプチドを、SDS-含有ポリアクリルアミドゲル中での電気泳動により分離した。放射性標識反応物の場合には、ポリアクリルアミドゲルをフルオログラフに付し、X線フィルムに対して露出した。未標識反応物に関しては、分離された蛋白を、トランスファーバッファー(3.03 g/LのTris、14.4 g/Lのグリシン、20%メタノール)中でゲルからPVDF膜に移した。膜をTBST(20 mM Tris、137 mM NaCl、0.1% Tween 20)中の5%乾燥乳中、室温で1時間ブロックし、次いで、TBSTで数回すすいだ。BVDV NS5B蛋白に特異的なウサギ抗体(Collett et al. (1988) J. Virol. 165: 200-208)をTBST中1:2000に希釈し、膜とともに室温で1時間インキュベーションした。膜をTBSTで数回洗浄し、次いで、HRP-抱合ロバ抗-ウサギ抗体(TBST中1:20000に希釈)とともに室温で1時間インキュベーションし、次いで、上で詳述したようにTBSTで洗浄した。ECLシステム(Amersham)を用いる化学発光により検出を行った。

【0109】

[35 S]-メチオニンの存在下における、DJB2-BVDV-NS5Bお

よびD J B 2 - B V D B - N S 5 A Bに由来するRNA転写物の翻訳により、放射性標識された75 k D a lおよび130 k D a lのポリペプチドがそれぞれ生じた(図7、それぞれトラック2および3)。これらのポリペプチドがN S 5 B配列を含む蛋白であるということが、N S 5 B配列に特異的な抗血清との免疫反応性により示された(図8)。D J B 2 - B V D V - N S 5 B RNAから生じた75 k D a lの蛋白(トラック7)は、組み換えバキュロウイルスから生じた精製N S 5 B(トラック1~4)と同時に移動した。D J B 2 - B V D V - N S 5 A B RNAの翻訳において、130 k D a lの蛋白は抗-N S 5 B抗血清により特異的に認識された唯一のポリペプチドであり、N S 5 A B蛋白に関して予想されたサイズであった(トラック6)。重要なことに、N S 5 Bのサイズの蛋白は5 A B RNA翻訳反応において検出されなかった。

【0110】

これらの結果は、D J B 2 - B V D V - N S 5 A B RNAが、予想された130 k D a lのN S 5 A B蛋白を生じ、さらに、この発現系においてN S 5 A B蛋白はN S 5 Bにプロセッシングされないことを示す。

【0111】

実施例2

転写-翻訳系において得られたB V D V N S 5 BおよびN S 5 A BのR d R p活性

実施例1の翻訳生成物のR d R p活性を調べるために、各翻訳反応物の部分試料を、46 mMのH E P E S (p H 8 . 0)、3 mMのM g C l₂、10 mMのD T T、各0 . 33 mMのA T P、G T PおよびU T P、30 μ C iの[³²P] C T P (400 C i / m m o l)およびM l u Iで直鎖状にされたプラスミドS A O - 2 aから合成された2 μ gのRNA転写物を含有する個々の30 μ Lの反応混合物に添加した。プラスミドS A O - 2 aは、ポリオウイルス配列のヌクレオチド6234~7205が切除されているプラスミドD J B 2 - B V D V - N S 5 Bの誘導体である。S A O - 2 aからのRNA転写物は約3 k bの長さであり、それらの3'末端にC G C G配列を有している。このC G C G配列の存在は、ポリオウイルスR d R pとともにRNA合成の自己プライミングが起こるこ

とを可能にすることがすでに示されており、2倍のサイズ(6 kb)の生成物を生じる(Barton et al., 1996)。RdRp反応物を30 で60分インキュベーションし、記載されたようにして(Barton et al., 1996) CH_3HgOH -1%アガロースゲル電気泳動により放射性標識RNAを分析した。

【0112】

予想されたように、NS5B翻訳生成物をポリメラーゼアッセイに使用した場合には、2倍のサイズ(6 kb)の放射性標識RNA生成物が検出された(図9、トラック2)。しかしながら、驚くべきことに、NS5AB翻訳生成物を評価した場合にも2倍のサイズの生成物が見られた(図9、トラック6)。2倍のサイズの生成物は模擬翻訳反応においては観察されなかった(図9、トラック4)。さらに、NS5AB蛋白の関して観察されたRdRp活性はNS5ABのNS5Bへのプロセッシングによるものでなかった。なぜなら、NS5BはNS5AB翻訳生成物のイムノブロット分析(実施例1)において検出されなかったからである。いくつかの反応において、ポリメラーゼアッセイに翻訳生成物を添加する前に、界面活性剤NP-40を翻訳生成物に添加した。このことにより、NS5BおよびNS5AB反応物の両方において、放射性標識生成物RNAの量が約2倍に増加した。

【0113】

これらの結果は、BV DV NS5AB蛋白が機能的なRdRpであることを明確に示す。

【0114】

実施例3

HCV NS5AB遺伝子のクローニング

当業者により常套的に使用されるいずれかの数の代用(surrogate)発現系中にNS5AB配列をクローニングしてもよく、該代用発現系は無細胞系、細菌、酵母、哺乳動物細胞、昆虫細胞および植物細胞系を包含するが、これらに限らない。例えば、感染個体の血清からHCV NS5AB配列を得てもよい。HCV感染患者の血清から単離されたRNAを用い、RT-入れ子PCRプロトコルを用いてHCV NS5AB遺伝子を増幅した。このRNAの部分試料を、Titan 0

ne Tube RT-PCR System (Boehringer-Mannheim) の50 μ Lの反応混合物に添加した。反応混合物は、1.5 mM $MgCl_2$ 、200 μ Mの各dNTP、5 mMのジチオスレイトール、10ユニットのRNasin (Promega)、300 nMのフォワードおよびリバースプライマーおよび1 μ Lの酵素ミックス (AMV およびExpand High Fidelity Enzyme mix) を含有する1X RT-PCRバッファからなっていた。RT-PCRサイクルを下記のごとく行った：工程1、50 で50分；工程2、94 で45秒；工程3、94 で45秒；工程4、55 で45秒；工程5、72 で150秒；工程6、工程3～5を14サイクル繰り返し；工程7、94 で45秒；工程8、55 で45秒；工程9、72 で150秒プラス付加的サイクルをそれぞれ5秒；工程10、工程7～9を24サイクル繰り返し。この第1ラウンドの反応物の一部を、Expand High Fidelity PCR System (Boehringer-Mannheim) を用いる入れ子PCR反応物に添加した。反応混合物は、1.5 mM $MgCl_2$ 、200 μ Mの各dNTP、300 nMのフォワードおよびリバースプライマー、および1 μ Lの酵素ミックスからなっていた。フォワードプライマーはRsrII制限酵素部位、翻訳開始のためのATGコドン、それに続くNS5A蛋白の最初の6つのコドンに対応する最初の18個のヌクレオチドを含んでいた。リバースプライマーは、停止コドンを含むNS5B遺伝子の3'末端に相補的な配列、それに続くNotI制限酵素部位を含んでいた。入れ子PCRサイクルを下記のごとく行った：工程1、94 で30秒；工程2、94 で45秒；工程3、52 で45秒；工程4、72 で150秒；工程5、工程2～4を9サイクル繰り返し；工程6、94 で45秒；工程7、60 で45秒；工程8、72 で150秒プラス付加的サイクルをそれぞれ5秒；工程9、工程6～8を14サイクル繰り返し。得られた生成物を、Qiagen's QIAquick Gel Extraction Kitを用いて1%アガロースゲルにて精製し、RsrIIおよびNotI制限酵素で消化し、前もってRsrIIおよびNotIで消化しておいたpFASTBAC (Gibco-BRL) 中にクローニングした。連結混合物をE. coli DH5細胞中に形質転換した。形質転換された細菌コロニーのうち1つはプラスミドbacHCV5AB-11を生じた。第2のコロニーはプラスミドbacHCV5AB-16を生じた。

【0115】

プラスミドbacHCV5AB-11およびbacHCV5AB-16中のNS5AB遺伝子のDNA配列および推定アミノ酸配列は配列番号：3（図3）、配列番号：4（図4）、配列番号：5（図5）および配列番号：6（図6）として同定される。

【0116】

実施例4

組み換えバキュロウイルスに感染した細胞におけるHCV NS5ABの発現

プラスミドbacHCV5AB-16を用いて、Bac-to-Bac System (Gibco-BRL) の転位法により組み換えバキュロウイルスを得た。bacHCV5AB-16プラスミドDNAをE. coli DH10Bac細胞中に形質転換後、製造者により提供された説明書に従ってbacmid DNAを含む数個のコロニーをSf9昆虫細胞中にトランスフェクションした。組み換えバキュロウイルスを単離し、増幅した。組み換えバキュロウイルスに感染した細胞におけるNS5AB蛋白発現を、HCV NS5AまたはMS5B配列のいずれかに特異的な抗血清を用いるウェスタンイムノブロット分析により証明した。bacHCV5AB-16ウイルスに感染したSf9昆虫細胞の溶解物を調製した。溶解物の部分試料をSDS-含有ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、実施例1において説明したように、ゲル中で分離された蛋白をPVDF膜に移し、次いで、HCV NS5A-またはNS5B-特異的抗血清のいずれかを用いて126キロダルトンのHCV NS5AB蛋白を検出した。

【0117】

実施例5

組み換えバキュロウイルスに感染した細胞からのHCV NS5ABのRdRp活性

Sf9細胞を模擬感染、あるいは組み換えバキュロウイルスbacHCV5B-4またはbacHCV5AB-16に感染させた。60時間後、細胞をペレット化させ、洗浄し、次いで、プロテアーゼ阻害剤を捕捉された培養体積の1/50の低張バッファー（10mM Tris-HCl, pH7.5、10mM Na

C1) に再懸濁した。氷上で30分後、ダウンス (dounce) ホモジナイザーで20ストローク、そして短時間超音波処理することにより細胞を破壊した。900 x g で5分間遠心分離することにより細胞残さおよび核を除去した。15000 x g で30分遠心分離することにより膜含有上清をペレット化させた。このペレットを、おだやかにダウンス (dounce) することにより培養体積の1/300の低張バッファーに再懸濁し、次いで、低張バッファー中に調製された67%ショ糖溶液と混合して、最終ショ糖濃度を60%とした。超遠心チューブ中でこの溶液を67%ショ糖溶液上に重層し、次いで、50%ショ糖溶液、次いで、10%ショ糖溶液を重層した。この不連続なショ糖グラジエントを90000 x g で16時間の遠心分離に供した。10%~15%ショ糖界面に存在する膜バンドを回収した。図10に示すイムノプロットに示されるように、b a c H C V 5 B - 4由来の物質 (トラック2) およびb a c H C V 5 A B - 16由来の物質 (トラック3) はNS5BおよびNS5AB蛋白をそれぞれ含んでいた。重要なことに、NS5AB調合物中にはNS5Bのサイズの蛋白は存在しなかった。

【0118】

膜結合NS5AB蛋白のRdRp活性を、標準的なRdRp反応系 (実施例2) において評価した。60分のインキュベーション後の反応生成物RNA中に取り込まれたトリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿可能放射活性を定量することによりRdRp活性を測定した。図11に示すように、バキュロウイルスにより産生されたNS5AB蛋白 (5AB) はRdRp活性を有している。模擬感染バキュロウイルス材料 (mock) においてはバックグラウンド活性のみが見られた。

【0119】

これらの結果は、インタクトなHCV NS5AB蛋白が機能的なRdRp活性を有するという驚くべき結果のみならず、膜結合形態として存在する場合にはNS5AB蛋白が活性のあるRdRp酵素であるという驚くべき結果を示すものである。

【0120】

実施例6

転写 - 翻訳系におけるHCV NS5ABの発現

プラスミドb a c H C V 5 A B - 1 1中のNS 5 A B遺伝子を鋳型として用いて、NA 5 A BおよびNS 5 B遺伝子の両方をP C R増幅した。NS 5 A BおよびNS 5 B用の5'プライマーはS m a I制限酵素部位、翻訳開始用のA T Gコドン、それに続くNS 5 AおよびNS 5 Bそれぞれのアミノ末端に対応する配列を含んでいた。3'プライマーはH C Vポリ蛋白コーディング領域用の停止コドン、それに続くN o t I制限酵素部位を含み、H C V NS 5 A BおよびNS 5 B遺伝子の両方を増幅するために用いられた。本質的には実施例1で説明したようにしてP C Rを行った。P C Rにより増幅されたフラグメントをプラスミドD J B 2中に連結し、実施例1で説明したようにしてE. coli中に形質転換した。制限消化パターンおよび配列決定によりプラスミドの細菌クローン由来のインサートが正しいものであることが証明され、D J B 2 - H C V - NS 5 BおよびD J B 2 - H C V - NS 5 A Bと命名された。

【0121】

プラスミドD J B 2 - H C V - NS 5 BおよびD J B 2 - H C V - NS 5 A BからRNA転写物を調製し、すべて実施例1で説明したようにしてNS 5 BおよびNS 5 A B蛋白を発現させるために使用した。図12は、[³⁵S]-メチオニンの存在下においてD J B 2 - H C V - NS 5 BおよびD J B 2 - H C V - NS 5 A Bに由来するRNA転写物から翻訳されたポリペプチドを示す。放射性標識NS 5 BおよびNS 5 A Bポリペプチドのみがそれぞれの生成蛋白であった(図12、それぞれトラック2および3)。

【0122】

これらのポリペプチドがNS 5 B配列を含む蛋白であるということが、H C V NS 5 B配列に特異的な抗血清とそれらとの免疫反応性により確認された(図13)。D J B 2 - H C V - NS 5 B RNAから生成した免疫反応性蛋白(トラック4)は組み換えバキュロウイルスから生成した精製H C V NS 5 B(トラック1)と同時に移動し、D J B 2 - H C V - NS 5 A B RNAの翻訳により生成した蛋白は抗-NS 5 B抗血清により特異的に認識された(トラック2)。重要なことに、NS 5 Bのサイズの蛋白はNS 5 A B翻訳反応において検出されなかった。

【0123】

これらの結果は、D J B 2 - H C V - N S 5 A B R N Aが予想された蛋白を生じ、さらに、N S 5 A B蛋白はインタクトであり、この発現系においてはN S 5 Bにまでプロセッシングされなかったことを示す。

【0124】

実施例7

転写 - 翻訳系におけるH C V N S 5 A BのR d R p活性

実施例6のポリペプチドがR d R p活性を有しているかどうかを調べるために、実施例6の各翻訳反応物の部分試料を、実施例2で説明したようにしてR N Aポリメラーゼ反応において評価した。R d R p反応物を30 で60分インキュベーションし、実施例2で説明したようにしてC H₃ H g O H - 1 %アガロースゲル電気泳動により放射性標識生成物R N Aを分析した。N S 5 BまたはN S 5 A B翻訳生成物のいずれをポリメラーゼアッセイに使用した場合でも、2倍のサイズの放射性標識R N A生成物が検出された。これらの結果は、H C V N S 5 B蛋白がR d R p活性を有することのみならず、意外なことに、H C V N S 5 A B蛋白もR d R p活性を有することを示す。

【0125】

さらに我々は、この系において生成されたH C V N S 5 B蛋白およびN S 5 A B蛋白の両方のR d R p活性のレベルが、ポリペプチドが膜結合形態で存在する場合に上昇することを見出した。実施例6の翻訳反応物を遠心分離して反応混合物の膜フラクションをペレット化させた。次いで、再懸濁された膜をR N Aポリメラーゼ反応混合物に添加し、R d R p活性を評価した。図14に示すように、膜結合N S 5 B蛋白(トラック2)およびN S 5 A B蛋白(トラック5)は両方とも活性のあるR N Aポリメラーゼであった。

【0126】

さらに、これらの結果により、前駆体および融合蛋白N S 5 A Bそれ自体が機能的なR d R p酵素であり、さらに、膜に結合した場合にH C V N S 5 B酵素およびN S 5 A B酵素の両方が機能するという、驚くべき知見が明らかとなった。

【0127】

実施例8

抗ウイルス組成物を見出すためのNS5AB蛋白の有用性

ウイルス蛋白のRdRp活性は、RNAウイルスにより引き起こされる感染および疾病の治療的介入または予防のための重要な標的である可能性がある。この活性をモジュレート、妨害あるいは阻害する作用剤を見出すための本発明のNS5AB活性の使用は、抗ウイルス剤を見出し、開発するための新規で、これまで予期されなかった手段である。

【0128】

新たに見出された本発明のNS5AB RdRp活性の有用性を示すために、1の用途において、実施例2および7の転写 - 翻訳生成物を用いて、RdRpに対する阻害活性に関して候補となる生物学的物質および化合物を試験し、評価してもよい。NS5AB RdRp活性を阻害する可能性のある特定の化学物質の濃度を上昇させて、標準的なRdRp反応混合物中で上記実施例のNS5AB含有物質をインキュベーションした。反応終了時に、TCA - 沈殿可能生成物中に取り込まれた放射活性を測定することによりRdRp活性を定量した。図15に示すように、物質1によるBVDV NS5AB蛋白のRdRp活性の用量依存的阻害ならびに物質2によるHCV NS5AB RdRp活性の用量依存的阻害が存在した。

【0129】

これらの結果は、本発明のNS5AB蛋白は、NS5AB蛋白の活性をモジュレートする可能性のある物質を評価するためのアッセイにおいて明らかに有用であることを示す。

【0130】

実施例9

抗ウイルス組成物を見出すためのNS5AB蛋白のさらなる有用性

もう1つのアプローチにおいて、ウイルスポリメラーゼおよび関連蛋白の新規阻害剤を見出すことは、しばしば、多数の化合物または化合物の混合物をスクリーニングする必要がある。かくして、高いスクリーニング能力を有するポリメラ

ーゼ活性のアッセイ、言い換えれば高処理量アッセイが望ましい。当業者によく知られた種々のアッセイ法があり、それらは多数の試料を効果的にスクリーニングすることを可能にするものであり（例えば、Cole, JL, in Meth Enzymology 275: 310-328 (1996)参照）、それらのいずれかがNS5AB RdRp活性の場合に適する可能性がある。これらの方法はいずれかの数の活性検出および測定法を用いるものであり、それらの方法は、放射線測定、比色、蛍光シグナルまたは化学発光シグナル（これらに限らない）を包含する。

【0131】

1のアプローチにおいて、本発明の機能的NS5AB蛋白のRdRp活性の高処理量アッセイが提供され、該酵素に対抗する活性に関して多数の化学物質または潜在的な阻害剤がスクリーニングされうる。アッセイは96-ウェルマイクロプレートにおいてフォーマットされ、TCA-沈殿可能RNA生成物中への放射標識NTPの取り込みにより、RNA鋳型-プライマーに関するポリメラーゼ活性を測定するものである。直接シンチレーションスペクトル測定法または燐光イメージング法のいずれによって放射活性を測定してもよい。

【0132】

まとめると、本発明は、ペスチウイルス、ヘパチウイルスおよび関連ウイルスのNS5A遺伝子およびNS5B遺伝子の配列の共直線的発現により得られる蛋白がその本来の配置において、NS5ABと称される機能的なポリペプチドであり、RNA-依存的RNAポリメラーゼ活性を有することを示すものである。この新規な組成物および活性は、診断、予防、治療および医薬への適用に有用な試験物質を同定するための標的を提供する。

【0133】

本開示を読んだ後、本発明の精神および範囲から離れることなく、他の種々の実施例が当業者に明らかであろう。すべてのかかる他の実施例は添付した請求の範囲に含まれることが意図される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Flanagan, James B.
Ogram, Sushma A.
Morasco, Barbara J.
Barone, Linda
Chang, Siu-Chi
Groarke, James M.
Collett, Marc S.
University of Florida
Viropharma

<120> Polymerase Compositions and Methods of
Use Thereof

<130> Viropharma and the University of Florida

<140> 60/167,068

<141> 1999-11-23

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 3648

<212> DNA

<213> Pestivirus

<400> 1

tccggaaatt	acattttgga	tttgatatac	ggcctacaca	agcaaatcaa	cagagggtcg	60
aagaaaaatg	tactgggggtg	ggcccctgca	ccctttagtt	gtgactggac	ccctagtgc	120
gagaggatca	gattgccaac	agacaactat	ttgagggtag	aaaccagggtg	cccatgtggc	180
tatgagatga	aagctttcaa	aaatgtaggt	ggcaaaacta	ccaaagtggga	ggagagcggg	240
cctttcctat	gtagaaacag	acctggtagg	ggaccagtca	actacagagt	caccaagtat	300
tacgatgaca	acctcagaga	gataaaacca	gtagcaaatg	tggaaaggaca	ggtagagcac	360
tactacaaag	gggtcacagc	aaaaattgac	tacagtaaaag	gaaaaatgct	cttggccact	420
gacaagtggg	agggtgaaca	tggtgtcata	accagggttag	ctaagagata	tactggggtc	480
gggttcaatg	gtgcataact	agggtgacgag	ccaatcacc	gtgctctagt	ggagagggac	540
tggtcaacta	taacccaaaa	cacagtacag	tttctaaaaa	tgaagaaggg	gtgtgcgttc	600
acctatgacc	tgaccatctc	caatctgacc	aggctcatcg	aactagtaca	caggaacaat	660
cttgaagaga	aggaaatacc	caccgctacg	gtcaccacat	ggctagctta	caccttcgtg	720
aatgaagacg	tagggactat	aaaaccagta	ctaggagaga	gagtaatccc	cgaccctgta	780
gttgatatca	atttacaacc	agaggtgcaa	gtggacacgt	cagagggttg	gatcacata	840
attggaagg	aaaccctgat	gacaacggga	gtgacacctg	tcttggaaaa	agtagagcct	900
gacgccagcg	acaaccaaaa	ctcgggtgaag	atcgggttg	atgagggtaa	ttaccagg	960
cctggaatac	agacacatac	actaacagaa	gaaatacaca	acagggatgc	gaggcccttc	1020
atcatgatcc	tgggctcaag	gaattccata	tcaaatagg	caaagactgc	tagaaatata	1080
aatctgtaca	caggaaatga	ccccaggga	atcggagact	tgatggctgc	agggcgcatg	1140
ttagtagtag	cactgaggga	tgtcgaccct	gagctgtctg	aaatgggtcga	tttcaagg	1200
acttttttag	ataggagggc	cctggaggct	ctaagtctcg	ggcaacctaa	accgaagcag	1260
gttaccagg	aagctgttag	gaatttgata	gaacagaaaa	aagatgtgga	gatccctaac	1320
tggtttgc	cagatgaccc	agtatttctg	gaagtggcct	taaaaaatga	taagtactac	1380
ttagtaggag	atggttgaga	ggtaaaaagat	caagctaaag	cacttggggc	cacggatcag	1440
acaagaatta	taaaggagg	aggctcaagg	acgtatgcca	tgaagctatc	tagctggttc	1500
ctccaggcat	caacaaaaca	gatgagttta	actccactgt	ttgaggaatt	gttgctacgg	1560
tgccacctg	caactaagag	caataagggg	cacatggcat	cagcttacca	attggcacag	1620
ggtaactggg	agcccctcgg	ttgcgggggtg	cacctaggta	caataccagc	cagaagggtg	1680
aagatacacc	catatgaagc	ttacctgaag	ttgaaagatt	tcatagaaga	agaagagaag	1740
aaacctagg	ttaaggatac	agtaataaga	gagcacaaca	aatggatact	taaaaaata	1800
aggtttcaag	gaaacctcaa	caccaagaaa	atgctcaacc	ctgggaaact	atctgaacag	1860
ttggacagg	agggcgcaa	gaggaacatc	tacaaccacc	agattggtac	tataatgtca	1920

```

agtgcaggca taaggctgga gaaattgcc aatagtggg cccaaaccga caccaaaacc 1980
tttcatgagg caataagaga taagatagac aagagtgaac accggcaaaa tccagaattg. 2040
cacacaacaa tggttgagat tttccacacg atagcccaac ccacctgaa acacacctac 2100
ggtgaggtga cgtgggagca acttgaggcg gggataaata gaaagggggc agcaggcttc 2160
ctggagaaga agaacatcgg agaagtattg gattcagaaa agcacctggt agaacaattg 2220
gtcagggatc tgaaggccgg gagaaagata aaatattatg aaactgcaat accaaaaaat 2280
gagaagagag atgtcagtga tgactggcag gcaggggacc tgggtggttg gaagaggcca 2340
agagttatcc aataccctga agccaagaca aggctagcca tcactaaggc catgtataac 2400
tgggtgaaac agcagcccg tgtgattcca ggatatgaag gaaagacccc cttgttcaac 2460
atctttgata aagtgaagaa ggaatgggac tcttcaatg agccagtggc cgtaagtttt 2520
gacaccaaag cctgggacac tcaagtgaat agtaaggatc tgcaacttat tggagaaatc 2580
cagaaatatt actataagaa ggagtggcac aagttcattg acaccatcac cgaccacatg 2640
acagaagtac cagttataac agcagatggt gaagtatata taagaaatgg gcagagaggg 2700
agcggccagc cagacacaag tgctggcaac agcatgttaa atgtcctgac aatgatgtac 2760
gccttctgcg aaagcacagg ggtaccgtac aagagtttca acagggtggc aaggatccac 2820
gtctgtgggg atgatggctt cttaataact gaaaaagggt tagggctgaa atttgctaac 2880
aaagggatgc agattcttca tgaagcaggg aaacctcaga agataacgga aggggaaaag 2940
atgaaagtgt cctatagatt tgaggatata gatttctgtt ctcatacccc agtccctgtt 3000
aggtggtccg acaacaccag tagtcacatg gccgggagag acaccgctgt gatactaca 3060
aagatggcaa caagattgga ttcaagtggg gagaggggta ccactgcata tgaaaaagcg 3120
gtagccttca gtttcttgct gatgtattcc tggaaacccg ttgtagggag gatttgctcg 3180
ttggtccttt cgcaacagcc agagacagac ccataaaaac atgccactta ttattacaaa 3240
ggatgatcaa taggggccta taaagatgta ataggtcgga atctaagtga actgaagaga 3300
acaggctttg agaaattggc aaatctaaac ctaagcctgt ccacgttggg gatctggact 3360
aagcacacaa gcaaaagaat aattcaggac tgtgttgcca ttgggaaaga agagggcaac 3420
tggtagttaa acgcccagac gctgatatcc agcaaaactg gccacttata catacctgat 3480
aaaggcttta cattacaagg aaagcattat gagcaactgc agctaagaac agagacaaac 3540
ccggtcatgg ggggtgggac tgagagatac aagttaggtc ccatagtcaa tctgctgctg 3600
agaagggtga aaattctgct catgacggcc gtcggcgctc gcagctga 3648

```

<210> 2
 <211> 1215
 <212> PRT
 <213> Pestivirus

```

<400> 2
Ser Gly Asn Tyr Ile Leu Asp Leu Ile Tyr Gly Leu His Lys Gln Ile
1 5 10 15
Asn Arg Gly Leu Lys Lys Met Val Leu Gly Trp Ala Pro Ala Pro Phe
20 25 30
Ser Cys Asp Trp Thr Pro Ser Asp Glu Arg Ile Arg Leu Pro Thr Asp
35 40 45
Asn Tyr Leu Arg Val Glu Thr Arg Cys Pro Cys Gly Tyr Glu Met Lys
50 55 60
Ala Phe Lys Asn Val Gly Gly Lys Leu Thr Lys Val Glu Glu Ser Gly
65 70 75 80
Pro Phe Leu Cys Arg Asn Arg Pro Gly Arg Gly Pro Val Asn Tyr Arg
85 90 95
Val Thr Lys Tyr Tyr Asp Asp Asn Leu Arg Glu Ile Lys Pro Val Ala
100 105 110
Lys Leu Glu Gly Gln Val Glu His Tyr Tyr Lys Gly Val Thr Ala Lys
115 120 125
Ile Asp Tyr Ser Lys Gly Lys Met Leu Leu Ala Thr Asp Lys Trp Glu
130 135 140
Val Glu His Gly Val Ile Thr Arg Leu Ala Lys Arg Tyr Thr Gly Val
145 150 155 160
Gly Phe Asn Gly Ala Tyr Leu Gly Asp Glu Pro Asn His Arg Ala Leu
165 170 175
Val Glu Arg Asp Cys Ala Thr Ile Thr Lys Asn Thr Val Gln Phe Leu
180 185 190
Lys Met Lys Lys Gly Cys Ala Phe Thr Tyr Asp Leu Thr Ile Ser Asn
195 200 205

```

Leu	Thr	Arg	Leu	Ile	Glu	Leu	Val	His	Arg	Asn	Asn	Leu	Glu	Glu	Lys
210						215				220					
Glu	Ile	Pro	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Thr	Trp	Leu	Ala	Tyr	Thr	Phe	Val
225					230					235					240
Asn	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Ile	Lys	Pro	Val	Leu	Gly	Glu	Arg	Val	Ile
				245					250					255	
Pro	Asp	Pro	Val	Val	Asp	Ile	Asn	Leu	Gln	Pro	Glu	Val	Gln	Val	Asp
			260				265					270			
Thr	Ser	Glu	Val	Gly	Ile	Thr	Ile	Ile	Gly	Arg	Glu	Thr	Leu	Met	Thr
		275					280					285			
Thr	Gly	Val	Thr	Pro	Val	Leu	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Asp
290						295				300					
Asn	Gln	Asn	Ser	Val	Lys	Ile	Gly	Leu	Asp	Glu	Gly	Asn	Tyr	Pro	Gly
305					310					315					320
Pro	Gly	Ile	Gln	Thr	His	Thr	Leu	Thr	Glu	Glu	Ile	His	Asn	Arg	Asp
				325					330					335	
Ala	Arg	Pro	Phe	Ile	Met	Ile	Leu	Gly	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Ser	Asn
			340				345						350		
Arg	Ala	Lys	Thr	Ala	Arg	Asn	Ile	Asn	Leu	Tyr	Thr	Gly	Asn	Asp	Pro
		355					360					365			
Arg	Glu	Ile	Arg	Asp	Leu	Met	Ala	Ala	Gly	Arg	Met	Leu	Val	Val	Ala
		370				375					380				
Leu	Arg	Asp	Val	Asp	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Met	Val	Asp	Phe	Lys	Gly
385					390					395					400
Thr	Phe	Leu	Asp	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Gln	Pro
				405					410					415	
Lys	Pro	Lys	Gln	Val	Thr	Lys	Glu	Ala	Val	Arg	Asn	Leu	Ile	Glu	Gln
			420				425						430		
Lys	Lys	Asp	Val	Glu	Ile	Pro	Asn	Trp	Phe	Ala	Ser	Asp	Asp	Pro	Val
		435					440					445			
Phe	Leu	Glu	Val	Ala	Leu	Lys	Asn	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Leu	Val	Gly	Asp
	450					455				460					
Val	Gly	Glu	Val	Lys	Asp	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln
465					470					475					480
Thr	Arg	Ile	Ile	Lys	Glu	Val	Gly	Ser	Arg	Thr	Tyr	Ala	Met	Lys	Leu
				485					490					495	
Ser	Ser	Trp	Phe	Leu	Gln	Ala	Ser	Asn	Lys	Gln	Met	Ser	Leu	Thr	Pro
			500					505					510		
Leu	Phe	Glu	Glu	Leu	Leu	Leu	Arg	Cys	Pro	Pro	Ala	Thr	Lys	Ser	Asn
		515					520					525			
Lys	Gly	His	Met	Ala	Ser	Ala	Tyr	Gln	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Trp	Glu
		530					535				540				
Pro	Leu	Gly	Cys	Gly	Val	His	Leu	Gly	Thr	Ile	Pro	Ala	Arg	Arg	Val
545					550					555					560
Lys	Ile	His	Pro	Tyr	Glu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Leu	Lys	Asp	Phe	Ile	Glu
				565					570					575	
Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Pro	Arg	Val	Lys	Asp	Thr	Val	Ile	Arg	Glu	His
			580					585					590		
Asn	Lys	Trp	Ile	Leu	Lys	Lys	Ile	Arg	Phe	Gln	Gly	Asn	Leu	Asn	Thr
		595					600					605			
Lys	Lys	Met	Leu	Asn	Pro	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Gln	Leu	Asp	Arg	Glu
		610				615					620				
Gly	Arg	Lys	Arg	Asn	Ile	Tyr	Asn	His	Gln	Ile	Gly	Thr	Ile	Met	Ser
625					630					635					640
Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Ile	Val	Arg	Ala	Gln	Thr
				645					650					655	
Asp	Thr	Lys	Thr	Phe	His	Glu	Ala	Ile	Arg	Asp	Lys	Ile	Asp	Lys	Ser
			660					665					670		
Glu	Asn	Arg	Gln	Asn	Pro	Glu	Leu	His	Asn	Lys	Leu	Leu	Glu	Ile	Phe
		675					680					685			
His	Thr	Ile	Ala	Gln	Pro	Thr	Leu	Lys	His	Thr	Tyr	Gly	Glu	Val	Thr
						695						700			

Trp	Glu	Gln	Leu	Glu	Ala	Gly	Ile	Asn	Arg	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Phe
705					710					715					720
Leu	Glu	Lys	Lys	Asn	Ile	Gly	Glu	Val	Leu	Asp	Ser	Glu	Lys	His	Leu
				725					730					735	
Val	Glu	Gln	Leu	Val	Arg	Asp	Leu	Lys	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Lys	Tyr
			740					745					750		
Tyr	Glu	Thr	Ala	Ile	Pro	Lys	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	Val	Ser	Asp	Asp
		755					760					765			
Trp	Gln	Ala	Gly	Asp	Leu	Val	Val	Glu	Lys	Arg	Pro	Arg	Val	Ile	Gln
	770					775					780				
Tyr	Pro	Glu	Ala	Lys	Thr	Arg	Leu	Ala	Ile	Thr	Lys	Val	Met	Tyr	Asn
785					790					795					800
Trp	Val	Lys	Gln	Gln	Pro	Val	Val	Ile	Pro	Gly	Tyr	Glu	Gly	Lys	Thr
			805						810					815	
Pro	Leu	Phe	Asn	Ile	Phe	Asp	Lys	Val	Arg	Lys	Glu	Trp	Asp	Ser	Phe
			820					825					830		
Asn	Glu	Pro	Val	Ala	Val	Ser	Phe	Asp	Thr	Lys	Ala	Trp	Asp	Thr	Gln
		835					840					845			
Val	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Gln	Leu	Ile	Gly	Glu	Ile	Gln	Lys	Tyr	Tyr
	850					855					860				
Tyr	Lys	Lys	Glu	Trp	His	Lys	Phe	Ile	Asp	Thr	Ile	Thr	Asp	His	Met
865					870					875					880
Thr	Glu	Val	Pro	Val	Ile	Thr	Ala	Asp	Gly	Glu	Val	Tyr	Ile	Arg	Asn
			885						890					895	
Gly	Gln	Arg	Gly	Ser	Gly	Gln	Pro	Asp	Thr	Ser	Ala	Gly	Asn	Ser	Met
			900					905					910		
Leu	Asn	Val	Leu	Thr	Met	Met	Tyr	Ala	Phe	Cys	Glu	Ser	Thr	Gly	Val
		915					920					925			
Pro	Tyr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Val	Ala	Arg	Ile	His	Val	Cys	Gly	Asp
	930					935					940				
Asp	Gly	Phe	Leu	Ile	Thr	Glu	Lys	Gly	Leu	Gly	Leu	Lys	Phe	Ala	Asn
945					950					955					960
Lys	Gly	Met	Gln	Ile	Leu	His	Glu	Ala	Gly	Lys	Pro	Gln	Lys	Ile	Thr
			965						970					975	
Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Lys	Val	Ala	Tyr	Arg	Phe	Glu	Asp	Ile	Glu	Phe
			980					985					990		
Cys	Ser	His	Thr	Pro	Val	Pro	Val	Arg	Trp	Ser	Asp	Asn	Thr	Ser	Ser
		995					1000					1005			
His	Met	Ala	Gly	Arg	Asp	Thr	Ala	Val	Ile	Leu	Ser	Lys	Met	Ala	Thr
	1010					1015						1020			
Arg	Leu	Asp	Ser	Ser	Gly	Glu	Arg	Gly	Thr	Thr	Ala	Tyr	Glu	Lys	Ala
1025					1030					1035					1040
Val	Ala	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Met	Tyr	Ser	Trp	Asn	Pro	Leu	Val	Arg
			1045						1050					1055	
Arg	Ile	Cys	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Gln	Gln	Pro	Glu	Thr	Asp	Pro	Ser
			1060					1065					1070		
Lys	His	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Asp	Pro	Ile	Gly	Ala	Tyr	Lys
		1075					1080					1085			
Asp	Val	Ile	Gly	Arg	Asn	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Gly	Phe	Glu
	1090					1095					1100				
Lys	Leu	Ala	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	Thr	Leu	Gly	Ile	Trp	Thr
1105					1110					1115					1120
Lys	His	Thr	Ser	Lys	Arg	Ile	Ile	Gln	Asp	Cys	Val	Ala	Ile	Gly	Lys
			1125						1130					1135	
Glu	Glu	Gly	Asn	Trp	Leu	Val	Asn	Ala	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser	Ser	Lys
			1140				1145					1150			
Thr	Gly	His	Leu	Tyr	Ile	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	Thr	Leu	Gln	Gly	Lys
		1155					1160					1165			
His	Tyr	Glu	Gln	Leu	Gln	Leu	Arg	Thr	Glu	Thr	Asn	Pro	Val	Met	Gly
	1170					1175					1180				
Val	Gly	Thr	Glu	Arg	Tyr	Lys	Leu	Gly	Pro	Ile	Val	Asn	Leu	Leu	Leu
1185						1190				1195					1200

Arg Arg Leu Lys Ile Leu Leu Met Thr Ala Val Gly Val Ser Ser
1205 1210 1215

<210> 3
<211> 3117
<212> DNA
<213> Hepacivirus

<400> 3
tccggctcgt ggctgagggga tgtctggggac tggatatgca cgggtgttgac tgacttcaag 60
acctggctcc agtccaagct cctgccgcgg ttgccggggg tccctttcct ctogtgtcag 120
cgcggttaca agggagtctg gcggggagac ggcacatgc agaccacctg cccatgtgga 180
gcacaaattg ccggacatgt caagaatggt tccatgagga ttaccggggc taaaacctgc 240
agcaacacgt ggcatggcac attccccatc aacacataca ctacggggcc ctgcacaccc 300
tccccggcgc ctaactactc caaggcgctg tggcgggtgg ccgctgagga gtacgtggag 360
gttacgcggg tgggggattt ccactacgta acgggcatga ccactgacaa cgtaaagtgc 420
ccttgccagg ttccggggccc cgaattcttc acggaagtgg atgggtgccc gttgcacagg 480
tacgctccgg cgtgcaaacc cctcctacgg gaggaggtta cattccaggt cgggctccac 540
cagtacctgg ttgggtcaca actcccatgc gagcccgaa cggatgtgac agtgctcact 600
tccatgctca ctgacccttc ccacatcaca gcaggggcgg ctaagcgtag gctggccaga 660
gggtctcccc cctccctggt cagctcttca gctagtcat tatctgcgcc ttccttgaag 720
gcaacatgca ctaccatcca tgactcccca gatgctgacc tcattgaggc caacctctcg 780
tggcggcagg agatggggcg gaacatcacc cgcgtggagt cagaaaataa ggtgggtgatt 840
ttggactctt tcgaccgcgt tagagcggag gaggatgaga gggagatata cgttccggcg 900
gagatctcgc gggaaaaccaa gaaatttccc gcagcgatgc cgtatggggc gcgccggat 960
tacaaccttc cactgataga gccctggaaa gaccggggct acgtgcctcc ggtgggtacat 1020
gggtgccccat tgccaccacac caaggccctc ccaataccac ccccgcgggc aaagaggaca 1080
ggtgtcctga cagagtccac cgtatcttct gccttggcgg aactcgccac gaagaccttc 1140
ggcagttccg aatcgtcggc cgtcgacagc ggcacggcga ccgccctcc tgaccagtcc 1200
tctgacgacg gcggagcagg atccgacgtt gactcgtact cctccatgcc ccccttgag 1260
ggagagccgg gggaccocga tctcagcgac ggtcttgggt ctaccgtgag tgaggaggct 1320
ggcagtcacg tcgtctgtct ctcagtgctt tacacgtgga caggcgcttt gattacacca 1380
tgcgtgcgag aggagagcaa gctgcccac aatgcgtga gcaacttttt gcttgcgccc 1440
cataacatgg tctatgccac aacatcccgc agcgcaagcc agcggcagaa gaaggtcact 1500
tttgacaggg tgcaagtcct ggatgaccac taccgggacg tgctcaagga gatgaaggcg 1560
aaggcgtcca cagtcaggc taaacttcta tccgtggaag aagcctgtaa gctgacccc 1620
ccacattcag ccagatccaa atttggctat ggggcgaagg acgtccgga cctatccagc 1680
aaggcgttta accacatcca ctccgtgtgg aaggacttgc tggaagacac tgagacacca 1740
attgacacca ccatcatggc aaaaaatgag gttttctgcg ttcaaccaga gaaaggaggc 1800
cgcaagccag ctgcctaat cgtgtaccca gacttggggg ttccgctgtg cgagaaaatg 1860
gccctctacg acgtggtctc cacccttcct caggctgtga tgggctcctc atacggattc 1920
cagtactctc ctggacagcg ggtcgagtcc ctggtgaatg cctggaagtc aaagaaatgc 1980
cctatgggct togcataatga caccgcgtgt ttcgactcaa cggtcaccga gaatgacac 2040
cgtgttgagg agtcaattta ccaatgttgt gacttggccc ccgaagccag acaggccata 2100
aggctcgctta cagagcggct ttatatcggg ggtcccctga ctaactcaaa agggcagagc 2160
tgcggttatc gccggtgccc tgcgagcggc gtactgacga ctactgccc taataacctc 2220
acatgttact tgaaggcctc tgcagcctgt cgagctgcaa agctccagga ctgcacgatg 2280
cttgtgtgag gagacgacct cgtcgttatc tgtgaaagcg cgggaaccca agaggacgag 2340
gcgagcctac gagtcttcac ggaggctatg actaggtaact ctgccccccc tggggacccc 2400
cccccaaccg aatacgactt ggagctaata acatcatgct cctccaacgt gtcggctcgcg 2460
cacgatgcat ctggcaaaag ggtatactac ctaccccgtg accccaccac ccccttgcg 2520
cgggctgcgt gggagacagc tagacacact ccagttaact cctggctagg caacatcatc 2580
atgtatgcgc ccactttgtg ggcaaggatg attctgatga ctacttctt ttccatcctt 2640
ctagcccagg agcaacttga aaaagcccta gattgtgaga tctacggggc cactactccc 2700
attgagccac ttgacctacc tcagatcatt caacgactcc atggtcttag cgcgttttca 2760
ctccacagtt actctccagg tgaatcaat aggggtggctt catgcctcag gaagcttggg 2820
gtaccaccct tgcgagtctg gagacatcgg gccagaagcg tccgcgctaa gttactgtcc 2880
caggggggga gggctgccac ttgtggcaag tacctcttca actgggcagt aaggaccaag 2940
cttaaaactca ctccaattcc ggctgcgtcc cagttggatt tatccggctg gttcgttgc 3000
ggttacagcg ggggagacat atatcacagc ctgtctcgtg cccgaccccg ctggttcatg 3060
tggtgcctac tctacttttc tgtaggggta ggcactctac tgctcccaaa ccgatga 3117

<210> 4
 <211> 1038
 <212> PRT
 <213> Hepacivirus

<400> 4
 Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys Thr Val Leu
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro Arg Leu Pro
 20 25 30
 Gly Val Pro Phe Leu Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg
 35 40 45
 Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile Ala
 50 55 60
 Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Thr Gly Pro Lys Thr Cys
 65 70 75 80
 Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Thr Tyr Thr Thr Gly
 85 90 95
 Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Lys Ala Leu Trp Arg
 100 105 110
 Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val Gly Asp Phe His
 115 120 125
 Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro Cys Gln Val
 130 135 140
 Pro Gly Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His Arg
 145 150 155 160
 Tyr Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Thr Phe Gln
 165 170 175
 Val Gly Leu His Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro
 180 185 190
 Glu Pro Asp Val Thr Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His
 195 200 205
 Ile Thr Ala Gly Ala Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro
 210 215 220
 Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Lys
 225 230 235 240
 Ala Thr Cys Thr Thr His His Asp Ser Pro Asp Ala Asp Leu Ile Glu
 245 250 255
 Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg Val
 260 265 270
 Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Arg
 275 280 285
 Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Ile Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg
 290 295 300
 Lys Thr Lys Lys Phe Pro Ala Ala Met Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp
 305 310 315 320
 Tyr Asn Pro Pro Leu Ile Glu Pro Trp Lys Asp Pro Gly Tyr Val Pro
 325 330 335
 Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Thr Lys Ala Pro Pro Ile
 340 345 350
 Pro Pro Pro Arg Arg Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Val
 355 360 365
 Ser Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly Ser Ser Glu
 370 375 380
 Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Pro Pro Asp Gln Ser
 385 390 395 400
 Ser Asp Asp Gly Gly Ala Gly Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser Met
 405 410 415
 Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly Ser
 420 425 430
 Trp Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Gly Glu Asp Val Val Cys Cys Ser
 435 440 445

Met	Ser	Tyr	Thr	Trp	Thr	Gly	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	Cys	Ala	Ala	Glu
450						455					460				
Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Ile	Asn	Ala	Leu	Ser	Asn	Phe	Leu	Leu	Ala	Pro
465					470					475					480
His	Asn	Met	Val	Tyr	Ala	Thr	Thr	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gln	Arg	Gln
				485					490					495	
Lys	Lys	Val	Thr	Phe	Asp	Arg	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Asp	His	Tyr	Arg
			500					505					510		
Asp	Val	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ala	Lys	Ala	Ser	Thr	Val	Lys	Ala	Lys
		515					520					525			
Leu	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Cys	Lys	Leu	Thr	Pro	Pro	His	Ser	Ala
530						535					540				
Arg	Ser	Lys	Phe	Gly	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Ser
545					550				555						560
Lys	Ala	Val	Asn	His	Ile	His	Ser	Val	Trp	Lys	Asp	Leu	Leu	Glu	Asp
			565						570					575	
Thr	Glu	Thr	Pro	Ile	Asp	Thr	Thr	Ile	Met	Ala	Lys	Asn	Glu	Val	Phe
			580					585					590		
Cys	Val	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Arg	Leu	Ile	Val
		595					600				605				
Tyr	Pro	Asp	Leu	Gly	Val	Arg	Val	Cys	Glu	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asp
610					615						620				
Val	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Gln	Ala	Val	Met	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gly	Phe
625					630					635					640
Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Asn	Ala	Trp	Lys
			645						650					655	
Ser	Lys	Lys	Cys	Pro	Met	Gly	Phe	Ala	Tyr	Asp	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp
			660				665					670			
Ser	Thr	Val	Thr	Glu	Asn	Asp	Ile	Arg	Val	Glu	Glu	Ser	Ile	Tyr	Gln
		675					680					685			
Cys	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala	Arg	Gln	Ala	Ile	Arg	Ser	Leu	Thr
690						695					700				
Glu	Arg	Leu	Tyr	Ile	Gly	Gly	Pro	Leu	Thr	Asn	Ser	Lys	Gly	Gln	Ser
705					710					715					720
Cys	Gly	Tyr	Arg	Arg	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Cys
			725						730					735	
Gly	Asn	Thr	Leu	Thr	Cys	Tyr	Leu	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Cys	Arg	Ala
			740					745					750		
Ala	Lys	Leu	Gln	Asp	Cys	Thr	Met	Leu	Val	Cys	Gly	Asp	Asp	Leu	Val
		755					760					765			
Val	Ile	Cys	Glu	Ser	Ala	Gly	Thr	Gln	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu	Arg
		770				775					780				
Val	Phe	Thr	Glu	Ala	Met	Thr	Arg	Tyr	Ser	Ala	Pro	Pro	Gly	Asp	Pro
785					790					795					800
Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Thr	Ser	Cys	Ser	Ser	Asn
			805						810					815	
Val	Ser	Val	Ala	His	Asp	Ala	Ser	Gly	Lys	Arg	Val	Tyr	Tyr	Leu	Thr
			820					825					830		
Arg	Asp	Pro	Thr	Thr	Pro	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Trp	Glu	Thr	Ala	Arg
		835				840						845			
His	Thr	Pro	Val	Asn	Ser	Trp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ile	Met	Tyr	Ala	Pro
		850				855					860				
Thr	Leu	Trp	Ala	Arg	Met	Ile	Leu	Met	Thr	His	Phe	Phe	Ser	Ile	Leu
865					870					875					880
Leu	Ala	Gln	Glu	Gln	Leu	Glu	Lys	Ala	Leu	Asp	Cys	Glu	Ile	Tyr	Gly
			885						890					895	
Ala	His	Tyr	Ser	Ile	Glu	Pro	Leu	Asp	Leu	Pro	Gln	Ile	Ile	Gln	Arg
			900					905					910		
Leu	His	Gly	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser	Leu	His	Ser	Tyr	Ser	Pro	Gly	Glu
		915					920					925			
Ile	Asn	Arg	Val	Ala	Ser	Cys	Leu	Arg	Lys	Leu	Gly	Val	Pro	Pro	Leu
930						935					940				

Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu Leu Ser
 945 950 955 960
 Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp Ala
 965 970 975
 Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser Gln Leu
 980 985 990
 Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile Tyr
 995 1000 1005
 His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Trp Cys Leu Leu
 1010 1015 1020
 Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg
 1025 1030 1035

<210> 5
 <211> 3117
 <212> DNA
 <213> Hepacivirus

<400> 5
 tccggctcgt ggctcaggga tgtctgggac tggatatgca cgggtgttgac tgacttcaag 60
 acctggctcc agtccaagct cctgcccggg ttgcccgggg tccctttcct ctctgtgtcag 120
 cgcgggtaca agggagctct gcccgggagac ggcatcatgc agaccacctg cccatgtgga 180
 gcacaaattg ccggacatgt caaaaatgtt tccatgagga tcaccgggcc taaaacctgc 240
 agcaacacgt ggcatggcac attccccatc aacacataca ccacaggccc ctgcacaccc 300
 tccccggcgc ctaactactc caaggcgtg tggcgggtgg ccgctgagga gtacgtggag 360
 gttacgcggg tgggggattt ccactacgta acgggcatga ccactgacaa cgtaaagtgc 420
 ccttgccagg ttccggcccc tgaattcttc acggaagtgg atggggtgcg gtgacacagg 480
 tacgctccgg cgtgcaaac cctctacagg gaggaggtta cattccaggt cgggctccac 540
 cagtacctgg ttgggtcaca actcccatgc gagcccgaac cggatgtgac agtgtctact 600
 tccatgctca ccgacccctc ccacatcaca gcaggggcgg ctaagcgtag gctggccaga 660
 gggtctcccc cctccctggc cagctcttca gctagtcat tatctgcgcc ttccttgaag 720
 gcaacgtgca ctacccatca tgactcccca gatgctgacc tcattgaggc caacctctctg 780
 tggcggcagg agatggggcg gaacatcacc cgcgtggagt cagaaaataa ggtgggtgatt 840
 ttggactctt tcgacccgct tcgagcggag gaggatgaga gggagatata cgttccggcg 900
 gaaatccctg ggaaaaccaa gaaatttccc gcagcgtatgc cgtatgggc gcgcccgat 960
 tacaaccctc cactgataga gccctggaag gaccgggct acgtgcctcc ggtggtacat 1020
 ggggtgcccac tgccacccac caaggccctt ccaataccac ccccgcgcg aaagaggaca 1080
 gttgtccctg cagagtcac cgtatcttct gccttggcgg aactcgccac gaagaccctc 1140
 ggaggttccc aatcgtcgcc cgtcgacagc ggcacggcga ccgccctcc tgaccagtc 1200
 tctgacgacg gcggcgagg atccgacgtt gactcgtact cctccatgcc ccccttgag 1260
 ggagagccgg gggacccgca tctcagcgac gggtcttggg ttaccgtgag tgaggaggtc 1320
 ggcgaggacg tcgtctgctg ctcatgtct tatacgtgga caggcgctct gattacacca 1380
 tgcgtgctgg aggagagcaa gctgcccac aatgcgctga gcaactcttt gcttgcgccc 1440
 cataacatgg tctatgccac aacatcccgc agcgaagcc agcggcagaa gaagggtcact 1500
 tttgacaggc tgcaagtctt ggtgaccac taccgggacg tgctcaagga gatgaaggcg 1560
 aaggcggtca cagtcaaggc taaacttcta tccgtggaag aagcctgtaa gctgacgccc 1620
 ccacattcag ccagatccaa atttggctat ggggcgaagg acgtccgga cctatccagc 1680
 aaggccgtta accacatcca ctccgtgtgg aagaacttgc tggaaagacac tgagacacca 1740
 attgacacca ccatcatggc aaaaaatgag gttttctgcg ttcaaccaga gaaaggaggc 1800
 cgcaagccag ctgcctaat cgtgtaccca gacttggggg ttccgctgtg cgagaaaatg 1860
 gccctctacg acgtggtctc cacccttctt caggctgtga tgggctcctc atacggatctc 1920
 cagtactctc ctggacagcg ggtcgagttc ctggtgaatg cctggaagtc aaagaaatgc 1980
 cctatgggct tcgcatatga ccccgtgtt ttgactcaa cggtcaccga gaatgacatc 2040
 cgtgttgagg agtcaattta ccaatgttgt gacttggccc ccgaagccag acaggccata 2100
 aggtcgctta cagagcggct ttatatcggg ggtccctga ctaactcaaa agggcagagc 2160
 tgcggttatc gccggtgccc tgagagcggc gtactgacga ctagctgagg taataccctc 2220
 acatgttact tgaaggcctc tcagacgtgt cgagctgcaa agctccagga ctgcacgatg 2280
 cttgtgtgag gagacgacct cgtcgttatc tgtgaaagcg cgggaaccca agaggacgag 2340
 gcgagcctac gactcttcac ggaggtatg actaggtact ctgccccccc tggggacccc 2400
 ccccaaccag aatacgactt ggagctaata acatcatgct cctccaacgt gtccggtcgcg 2460
 cacgtgcat ctggcaaaag ggtatactac ctacccgtg accccaccac ccccttgcg 2520
 cgggctgcgt gggagacagc tagacacact ccagttaact cctggctagg caacatcatc 2580

```

atgtatgcgc ccactttgtg ggcaaggatg attctgatga ctcaattctt ctccatcctt 2640
ctagcccagg agcaacttga aaaagcccta gattgtgaga tctacggggc ccactactcc 2700
attgagccac ttgacctacc tcagatcatt caacgactcc atggtcttag cgcgttttca 2760
ctccacagtt actctccagg tgaaatcaat aggggtggctt catgcctcag gaagcttggg 2820
gtaccaccct tgcgagtctg gagacatcgg gccagaagcg tccgcgctaa attactgtcc 2880
caggggggga gggctgccac ttgtggcaag tacctcttca actgggcagt aaagaccaag 2940
cttaaactca ctccaattcc ggctgcgtcc cagttggatt tatccggctg gttcgttgct 3000
ggttacagcg ggggagacat atatacagc ctgtctcgtg cccgaccccg ctggttcatg 3060
tggtgcctac tcctactttc tgtaggggta ggcattctacc tgctcccaa ccatga 3117

```

<210> 6
 <211> 1038
 <212> PRT
 <213> Hepacivirus

<400> 6

Ser	Gly	Ser	Trp	Leu	Arg	Asp	Val	Trp	Asp	Trp	Ile	Cys	Thr	Val	Leu
1				5					10					15	
Thr	Asp	Phe	Lys	Thr	Trp	Leu	Gln	Ser	Lys	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro
			20						25				30		
Gly	Val	Pro	Phe	Leu	Ser	Cys	Gln	Arg	Gly	Tyr	Lys	Gly	Val	Trp	Arg
		35					40					45			
Gly	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Thr	Thr	Cys	Pro	Cys	Gly	Ala	Gln	Ile	Ala
	50					55					60				
Gly	His	Val	Lys	Asn	Gly	Ser	Met	Arg	Ile	Thr	Gly	Pro	Lys	Thr	Cys
	65				70					75				80	
Ser	Asn	Thr	Trp	His	Gly	Thr	Phe	Pro	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Thr	Gly
			85						90				95		
Pro	Cys	Thr	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ser	Lys	Ala	Leu	Trp	Arg
			100					105					110		
Val	Ala	Ala	Glu	Glu	Tyr	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Val	Gly	Asp	Phe	His
		115					120					125			
Tyr	Val	Thr	Gly	Met	Thr	Thr	Asp	Asn	Val	Lys	Cys	Pro	Cys	Gln	Val
	130					135					140				
Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Phe	Thr	Glu	Val	Asp	Gly	Val	Arg	Leu	His	Arg
	145				150					155				160	
Tyr	Ala	Pro	Ala	Cys	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg	Glu	Glu	Val	Thr	Phe	Gln
			165						170					175	
Val	Gly	Leu	His	Gln	Tyr	Leu	Val	Gly	Ser	Gln	Leu	Pro	Cys	Glu	Pro
		180						185					190		
Glu	Pro	Asp	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Met	Leu	Thr	Asp	Pro	Ser	His
		195				200						205			
Ile	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Lys	Arg	Arg	Leu	Ala	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro
	210					215					220				
Ser	Leu	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu	Lys
	225					230				235				240	
Ala	Thr	Cys	Thr	Thr	His	His	Asp	Ser	Pro	Asp	Ala	Asp	Leu	Ile	Glu
			245						250				255		
Ala	Asn	Leu	Leu	Trp	Arg	Gln	Glu	Met	Gly	Gly	Asn	Ile	Thr	Arg	Val
			260					265					270		
Glu	Ser	Glu	Asn	Lys	Val	Val	Ile	Leu	Asp	Ser	Phe	Asp	Pro	Leu	Arg
		275					280					285			
Ala	Glu	Glu	Asp	Glu	Arg	Glu	Ile	Ser	Val	Pro	Ala	Glu	Ile	Leu	Arg
	290					295					300				
Lys	Thr	Lys	Lys	Phe	Pro	Ala	Ala	Met	Pro	Val	Trp	Ala	Arg	Pro	Asp
	305				310					315				320	
Tyr	Asn	Pro	Pro	Leu	Ile	Glu	Pro	Trp	Lys	Asp	Pro	Gly	Tyr	Val	Pro
			325						330				335		
Pro	Val	Val	His	Gly	Cys	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Lys	Ala	Pro	Pro	Ile
			340					345					350		
Pro	Pro	Pro	Arg	Arg	Lys	Arg	Thr	Val	Val	Leu	Thr	Glu	Ser	Thr	Val
	355						360					365			

Ser	Ser	Ala	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Gly	Ser	Ser	Glu
370						375					380				
Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Ser	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Gln	Ser
385					390					395					400
Ser	Asp	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met
				405					410						415
Pro	Pro	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp	Pro	Asp	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser
			420					425					430		
Trp	Phe	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Val	Cys	Cys	Ser
		435					440					445			
Met	Ser	Tyr	Thr	Trp	Thr	Gly	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	Cys	Ala	Ala	Glu
		450				455					460				
Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Ile	Asn	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Ala	Pro
465					470					475					480
His	Asn	Met	Val	Tyr	Ala	Thr	Thr	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gln	Arg	Gln
				485					490					495	
Lys	Lys	Val	Thr	Phe	Asp	Arg	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Asp	His	Tyr	Arg
		500						505					510		
Asp	Val	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ala	Lys	Ala	Ser	Thr	Val	Lys	Ala	Lys
		515					520					525			
Leu	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Cys	Lys	Leu	Thr	Pro	Pro	His	Ser	Ala
		530				535					540				
Arg	Ser	Lys	Phe	Gly	Tyr	Gly	Ala	Lys	Asp	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Ser
545					550					555					560
Lys	Ala	Val	Asn	His	Ile	His	Ser	Val	Trp	Lys	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp
			565						570					575	
Thr	Glu	Thr	Pro	Ile	Asp	Thr	Thr	Ile	Met	Ala	Lys	Asn	Glu	Val	Phe
			580					585					590		
Cys	Val	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Arg	Leu	Ile	Val
		595					600					605			
Tyr	Pro	Asp	Leu	Gly	Val	Arg	Val	Cys	Glu	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asp
		610				615					620				
Val	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Gln	Ala	Val	Met	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gly	Phe
625					630					635					640
Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Asn	Ala	Trp	Lys
				645					650					655	
Ser	Lys	Lys	Cys	Pro	Met	Gly	Phe	Ala	Tyr	Asp	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp
			660				665						670		
Ser	Thr	Val	Thr	Glu	Asn	Asp	Ile	Arg	Val	Glu	Glu	Ser	Ile	Tyr	Gln
		675					680					685			
Cys	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala	Arg	Gln	Ala	Ile	Arg	Ser	Leu	Thr
		690				695					700				
Glu	Arg	Leu	Tyr	Ile	Gly	Gly	Pro	Leu	Thr	Asn	Ser	Lys	Gly	Gln	Ser
705					710					715					720
Cys	Gly	Tyr	Arg	Arg	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Cys
			725						730					735	
Gly	Asn	Thr	Leu	Thr	Cys	Tyr	Leu	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Cys	Arg	Ala
			740				745						750		
Ala	Lys	Leu	Gln	Asp	Cys	Thr	Met	Leu	Val	Cys	Gly	Asp	Asp	Leu	Val
		755					760					765			
Val	Ile	Cys	Glu	Ser	Ala	Gly	Thr	Gln	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu	Arg
		770					775				780				
Val	Phe	Thr	Glu	Ala	Met	Thr	Arg	Tyr	Ser	Ala	Pro	Pro	Gly	Asp	Pro
785					790					795					800
Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Leu	Ile	Thr	Ser	Cys	Ser	Ser	Asn
			805						810					815	
Val	Ser	Val	Ala	His	Asp	Ala	Ser	Gly	Lys	Arg	Val	Tyr	Tyr	Leu	Thr
			820					825					830		
Arg	Asp	Pro	Thr	Thr	Pro	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Trp	Glu	Thr	Ala	Arg
		835					840					845			
His	Thr	Pro	Val	Asn	Ser	Trp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ile	Met	Tyr	Ala	Pro
		850					855				860				

```

Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Ile Leu
865                               870           875           880
Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Glu Ile Tyr Gly
                               885           890           895
Ala His Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile Gln Arg
900                               905           910
Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro Gly Glu
915                               920           925
Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro Pro Leu
930                               935           940
Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Lys Leu Leu Ser
945                               950           955           960
Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp Ala
                               965           970           975
Val Lys Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser Gln Leu
980                               985           990
Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile Tyr
995                               1000          1005
His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Trp Cys Leu Leu
1010                              1015          1020
Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg
1025                              1030          1035

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、BVDV NS5AB蛋白をコードする核酸配列（配列番号：1）を示す。

【図2】 図2は、配列番号：1によるBVDV NS5AB蛋白の推定アミノ酸配列（配列番号：2）を示す。

【図3】 図3は、HCV NS5AB蛋白をコードする核酸配列（配列番号：3）を示す（クローン11）。

【図4】 図4は、配列番号：3によるHCV NS5AB蛋白の推定アミノ酸配列（配列番号：4）を示す。

【図5】 図5は、HCV NS5AB蛋白をコードする核酸配列（配列番号：5）を示す（クローン16）。

【図6】 図6は、配列番号：5によるHCV NS5AB蛋白の推定アミノ酸配列（配列番号：6）を示す。

【図7】 図7は、模擬翻訳反応（M）、あるいはDJB2-BVDV-NS5B（5B）およびDJB2-BVDV-NS5AB（5AB）RNAによりプログラムされた翻訳反応により合成された放射性標識ポリペプチドを分離したSDSゲルのフルオログラフを示す。分子量標準（キロダルトン）の位置を右に示す。

【図8】 図8は、抗-BVDV NS5B抗血清でプローブされたSDS

ゲルのイムノプロットを示し、該ゲルにおいて模擬反応(M)、あるいはDJB2-BVDV-NS5B(5B)およびDJB2-BVDV-NS5AB(5AB)RNAによりプログラムされた翻訳反応の生成物が分離されている。種々の量(200、100、50および10ng)の精製NS5Bを標準として含めた(それぞれトラック1~4)。

【図9】 図9は、RdRp反応混合物中、RNA鋳型添加(+)または無添加(-)で行われた模擬反応(M)、あるいはDJB2-BVDV-NS5B(5B)およびDJB2-BVDV-NS5AB(5AB)RNAによりプログラムされた翻訳反応の生成物を含むRdRp反応から得た放射性標識された生成物RNAの CH_3HgOH アガロースゲルのオートラジオグラムを示す。インプットされた自己プライミングRNA鋳型の位置を「1X」で示し、完成された二本鎖生成物を「2X」で示す。

【図10】 図10は、抗-HCV NS5B抗血清でプローブされたSDSゲルのイムノプロットを示し、該ゲルにおいて模擬感染Sf9細胞(M)または組み換えバキュロウイルスbacHCV5B-4(5B)およびbacHCV5AB-16(5AB)のいずれかに感染した細胞から調製された膜フラクションが分離されている。

【図11】 図11は、模擬感染(mock)またはbacHCV5AB-16-感染(5AB)Sf9細胞から調製された2または4 μl の膜フラクションを含むRdRp反応物から得た反応性生物RNA中に取り込まれたTCA-沈殿可能な放射活性を示す。

【図12】 図12は、模擬反応(M)、あるいはDJB2-BVDV-NS5B(5B)およびDJB2-BVDV-NS5AB(5AB)RNAによりプログラムされた翻訳反応により合成された放射性標識ポリペプチドが分離されたSDSゲルのフルオログラムを示す。分子量標準(キロダルトン)の位置を右に示す。

【図13】 図13は、抗HCV NS5B抗血清でプローブされたSDSゲルのイムノプロットを示し、該ゲルにおいて模擬反応(M)、あるいはDJB2-BVDV-NS5B(5B)およびDJB2-BVDV-NS5AB(5A

B) RNAによりプログラムされた反応の翻訳生成物が分離された。組み換えバキュロウイルスbacHCV5B-4により産生された精製HCV NS5Bを標準として含めた(トラック1)。

【図14】 図14は、RdRp反応混合物中、RNA鋳型添加(+)または無添加(-)で行われた模擬反応、あるいはDJB2-BVDV-NS5B(5B)およびDJB2-BVDV-NS5AB(5AB)翻訳生成物を含むRdRp反応から得た放射性標識された生成物RNAの CH_3HgOH アガロースゲルのオートラジオグラムを示す。インプットされた自己プライミングRNA鋳型の位置を「1X」で示し、完成された二本鎖生成物を「2X」で示す。

【図15】 図15は、小型分子物質1による実施例2のBVDV NS5ABのRdRp活性に対する用量依存的阻害、ならびに化学的に異なる小型分子物質(物質2)による実施例7のHCV NS5ABのRdRp活性に対する用量依存的阻害を示す。

【図1A】

```

TCCGGAAATTACATTTTGGATTTGATATACGGCCTACACAAGCAAATCAA 50
CAGAGGGCTGAAGAAAATGGTACTGGGGTGGGCCCCCTGCACCCTTTAGTT 100
GTGACTGGACCCCTAGTGACGAGAGGATCAGATTGCCAACAGACAACATAT 150
TTGAGGGTAGAAACCAGGTGCCCATGTGGCTATGAGATGAAAGCTTTCAA 200
AAATGTAGGTGGCAAACCTTACCAAAGTGGAGGAGAGCGGGCCTTTCTAT 250
GTAGAAACAGACCTGGTAGGGGACCAGTCAACTACAGAGTCACCAAGTAT 300
TACGATGACAACCTCAGAGAGATAAAAACCAGTAGCAAAGTTGGAAGGACA 350
GGTAGAGCACTACTACAAAGGGGTACAGCAAAAATTGACTACAGTAAAG 400
GAAAAATGCTCTTGGCCACTGACAAGTGGGAGGTGGAACATGGTGTCTATA 450
ACCAGGTTAGCTAAGAGATATACTGGGGTTCGGGTTCAATGGTGCATACTT 500
AGGTGACGAGCCCAATCACCGTGCTCTAGTGGAGAGGGACTGTGCAACTA 550
TAACCAAAAACACAGTACAGTTTCTAAAAATGAAGAAGGGGTGTGCGTTC 600
ACCTATGACCTGACCATCTCCAATCTGACCAGGCTCATCGAACTAGTACA 650
CAGGAACAATCTTGAAGAGAAGGAAATACCCACCGCTACGGTCACCACAT 700
GGCTAGCTTACACCTTCGTGAATGAAGACGTAGGGACTATAAAACCAGTA 750
CTAGGAGAGAGAGTAATCCCCGACCCTGTAGTTGATATCAATTTACAACC 800
AGAGGTGCAAGTGGACACGTCAGAGGTTGGGATCACAATAATTGGAAGGG 850
AAACCCTGATGACAACGGGAGTGACACCTGTCTTGAAAAAGTAGAGCCT 900
GACGCCAGCGACAACCAAAACTCGGTGAAGATCGGGTTGGATGAGGGTAA 950
TTACCCAGGGCCTGGAATACAGACACATACACTAACAGAAGAAATACACA 1000
ACAGGGATGCGAGGCCCTTCATCATGATCCTGGGCTCAAGGAATTCATA 1050
TCAAATAGGGCAAAGACTGCTAGAAATATAAACTGTACACAGGAAATGA 1100
CCCCAGGGAAATACGAGACTTGATGGCTGCAGGGCGCATGTTAGTAGTAG 1150
CACTGAGGGATGTGACCCCTGAGCTGTCTGAAATGGTCGATTTCAAGGGG 1200
ACTTTTTTAGATAGGGAGGCCCTGGAGGCTCTAAGTCTCGGGCAACCTAA 1250
ACCGAAGCAGGTTACCAAGGAAGCTGTTAGGAATTTGATAGAACAGAAAA 1300
AAGATGTGGAGATCCCTAACTGGTTTGCATCAGATGACCCAGTATTTCTG 1350
GAAGTGGCCTTAAAAAATGATAAGTACTACTTAGTAGGAGATGTTGGAGA 1400
GGTAAAAGATCAAGCTAAAGCACTTGGGGCCACGGATCAGACAAGAATTA 1450
TAAAGGAGGTAGGCTCAAGGACGTATGCCATGAAGCTATCTAGCTGGTTC 1500
CTCCAGGCATCAACAAAACAGATGAGTTTAACTCCACTGTTTGAGGAATT 1550
GTTGCTACGGTGCCACCTGCAACTAAGAGCAATAAGGGGCACATGGCAT 1600

```

Fig. 1A

【図1B】

```

CAGCTTACCAATTGGCACAGGGTAACTGGGAGCCCCCTCGGTTGCGGGGTG 1650
CACCTAGGTACAATAACCAGCCAGAAGGGTGAAGATACACCCATATGAAGC 1700
TTACCTGAAGTTGAAAGATTTTCATAGAAGAAGAAGAGAAGAAACCTAGGG 1750
TTAAGGATACAGTAATAAGAGAGCACAACAAATGGATACTTAAAAAATA 1800
AGGTTTCAAGGAAACCTCAACACCAAGAAAATGCTCAACCCTGGGAAACT 1850
ATCTGAACAGTTGGACAGGGAGGGGCGCAAGAGGAACATCTACAACCACC 1900
AGATTGGTACTATAATGTCAAGTGCAGGCATAAGGCTGGAGAAATTGCCA 1950
ATAGTGAGGGCCCAAACCGACACCAAAACCTTTTCATGAGGCAATAAGAGA 2000
TAAGATAGACAAGAGTGAAAACCGGCAAAATCCAGAATTGCACAACAAAT 2050
TGTTGGAGATTTTCCACACGATAGCCCAACCCACCCTGAAACACACCTAC 2100
GGTGAGGTGACGTGGGAGCAACTTGAGGCGGGGATAAATAGAAAAGGGGGC 2150
AGCAGGCTTCCTGGAGAAGAAGAACATCGGAGAAGTATTGGATTTCAGAAA 2200
AGCACCTGGTAGAACAATTGGTCAGGGATCTGAAGGCCGGGAGAAAAGATA 2250
AAATATTATGAACTGCAATACCAAAAAATGAGAAGAGAGATGTCAGTGA 2300
TGAATGGCAGGCAGGGGACCTGGTGGTTGAGAAGAGGCCAAGAGTTATCC 2350
AATACCCTGAAGCCAAGACAAGGCTAGCCATCACTAAGGTCATGTATAAC 2400
TGGGTGAAACAGCAGCCCCGTTGTGATTCCAGGATATGAAGGAAAGACCCC 2450
CTTGTTCAACATCTTTGATAAAGTGAGAAAGGAATGGGACTCGTTCAATG 2500
AGCCAGTGCCCGTAAGTTTGTGACACCAAAAGCCTGGGACACTCAAGTGACT 2550
AGTAAGGATCTGCAACTTATTGGAGAAATCCAGAAATATTACTATAAGAA 2600
GGAGTGGCACAAGTTCATTGACACCATCACCGACCACATGACAGAAGTAC 2650
CAGTTATAACAGCAGATGGTGAAGTATATATAAGAAATGGGCAGAGAGGG 2700
AGCGGCCAGCCAGACACAAGTGCTGGCAACAGCATGTTAAATGTCCTGAC 2750
AATGATGTACGCCTTCTGCGAAAGCACAGGGGTACCGTACAAGAGTTTCA 2800
ACAGGGTGGCAAGGATCCACGTCTGTGGGGATGATGGCTTCTTAATAACT 2850
GAAAAAGGGTTAGGGCTGAAATTTGCTAACAAAGGGATGCAGATTCTTCA 2900
TGAAGCAGGCAAAACCTCAGAAGATAACGGAAGGGGAAAAGATGAAAAGTTG 2950
CCTATAGATTTGAGGATATAGAGTTCTGTTCTCATACCCCAGTCCCTGTT 3000
AGGTGGTCCGACAACACCAAGTAGTCACATGGCCGGGAGAGACACCGCTGT 3050
GATACTATCAAAGATGGCAACAAGATTGGATTCAAGTGGAGAGAGGGGTA 3100
CCACTGCATATGAAAAAGCGGTAGCCTTCAGTTTCTTGCTGATGTATTCC 3150
TGGAACCCGCTTGTTAGGAGGATTTGCCTGTTGGTCCTTTTCGCAACAGCC 3200
AGAGACAGACCCATCAAAACATGCCACTTATTATTACAAAGGTGATCCAA 3250

```

Fig. 1B

【図1C】

TAGGGGCCCTATAAAGATGTAATAGGTCGGAATCTAAGTGAAGTGAAGAGA	3300
ACAGGCTTTGAGAAATTGGCAAATCTAAACCTAAGCCTGTCCACGTTGGG	3350
GATCTGGACTAAGCACACAAGCAAAAGAATAATTCAGGACTGTGTTGCCA	3400
TTGGGAAAGAAGAGGGCAACTGGCTAGTTAACGCCGACAGGCTGATATCC	3450
AGCAAACTGGCCACTTATACATACCTGATAAAGGCTTTACATTACAAGG	3500
AAAGCATTATGAGCAACTGCAGCTAAGAACAGAGACAAACCCGGTCATGG	3550
GGGTTGGGACTGAGAGATACAAGTTAGGTCCCATAGTCAATCTGCTGCTG	3600
AGAAGGTTGAAAATTCTGCTCATGACGGCCGTCGGCGTCAGCAGCTGA	3648

Fig. 1C

【図2】

SGNYILDLIYGLHKQINRGLKKMVLGWAPAPFSCDWTPSDEIRLPTDNY	50
LRVETRCPCGYEMKAFKNVGGKLTKEESGPFLCRNRPGRGPVNYRVTKY	100
YDDNLREIKPVAKLEGQVEHYKGVTAIDYSKGKMLLATDKWEVEHGV	150
TRLAKRYTGVGFNGAYLGDEPNHRALVERDCATITKNTVQFLKMKKGCAF	200
TYDLTISNLTRLIELVHRNNLEEKEIPTATVTTWLAYTFVNEDVGTIKPV	250
LGERVIPDPVVDINLQPEVQVDTSEVGITIIIGRETLMTGVTVPLEKVEP	300
DASDNQNSVKIGLDEGNYPGPGIQTHTLTEEIHNRDARPFIMILGSRNSI	350
SNRAKTARNINLYTGNDPREIRDLMAAGRMLVVALRDVDPELSEMVDKFG	400
TFLDREALEALS LGQPKPKQVTKEAVRNLI EQKKDVEIPNWFASDDPVFL	450
EVALKNDKYYLVGDVGEVKDQAKALGATDQTRIIKEVGSRTYAMKLSSWF	500
LQASNKQMSLTPLEELLLRCPATKSNKGHMASAYQLAQGNWEPLGCGV	550
HLGTIPARRVKIHPYEAYLKLKDFIEBEEKPRVKD TVIREHNKWILKKI	600
RFQGNLNTKKMLNPGKLSEQLDREGRKRNIYNHQIGTIMSSAGIRLEKLP	650
IVRAQTDTKTFHEAIRDKIDKSENQNP ELHNKLEIFHTIAQPTLKHTY	700
GEVTWEQLEAGINRKGAGFLEKKNIGEVLDSEKHLVEQLVRDLKAGRKI	750
KYYETAIPKNEKRDVSDDWQAGDLVVEKRPRVIQYPEAKTRLAITKVMYN	800
WVKQQPVVIPGYEGKTPLFNIFDKVRKEWDSFNEPVAVSFDTKAWDTQVT	850
SKDLQLIGEIQKYYYKKEWHKFIDTITDHMTVEVPVITADGEVYIRNGQRG	900
SGQPDT SAGNSMLNVL TMMYAFCESTGV PYKSFNRVARIHVC GDDGFLIT	950
EKGLGLKFANKGMQILHEAGKPQKITEGEKMKVAYRFEDIEFCSHTFPVPV	1000
RWSDNTSSH MAGRDTAVILSKMATRLDSS GERGTTAYEKAVAFSFLMYS	1050
WNPLVRRICLLVLSQQPETDPSKHATYYYKGDPIGAYKDVIGRNLSELKR	1100
TGFEKLANLNL SLSTLGIWTKHTSKRIIQDCVAIGKEEGNWL VNADRLIS	1150
SKTGHLIYIPDKGFTLQ GKHYEQ LQLRTETNPVMGVGTERYKLGPIVNLLL	1200
RRLKILLMTAVGVSS*	1215

Fig. 2

【図3A】

```

TCCGGCTCGTGGCTGAGGGATGTCTGGGACTGGATATGCACGGTGTGAC 50
TGACTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGGTTGCCGGGGG 100
TCCCTTTCTCTCTCGTGTGAGCGCGGGTACAAGGGAGTCTGGCGGGGAGAC 150
GGCATCATGCAGACCACCTGCCCATGTGGAGCACAAATTGCCGGACATGT 200
CAAGAATGGTTCCATGAGGATTACCGGGCCTAAAACCTGCAGCAACACGT 250
GGCATGGCACATTCCCCATCAACACATACACTACGGGCCCCCTGCACACCC 300
TCCCCGGCGCCTAACTACTCCAAGGCGCTGTGGCGGGTGGCCGCTGAGGA 350
GTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCTACTACGTAACGGGCATGA 400
CCTACTGACAACGTAAAGTGCCCTTGCCAGGTTCCGGGCCCCGAATTCTTC 450
ACGGAAGTGGATGGGGTGCAGTTGCACAGGTACGCTCCGGCGTGCAAACC 500
CCTCCTACGGGAGGAGGTTACATTCCAGGTCCGGGCTCCACCAGTACCTGG 550
TTGGGTCACAACTCCCATGCGAGCCCCGAACCGGATGTGACAGTGCTCACT 600
TCCATGCTCACTGACCCCTCCACATCACAGCAGGGGCGGCTAAGCGTAG 650
GCTGGCCAGAGGGTCTCCCCCTCCCTGGCCAGCTCTTCAGCTAGTCAGT 700
TATCTGCGCCTTCTTGAAGGCAACATGCACTACCCATCATGACTCCCCA 750
GATGCTGACCTCATTGAGGCCAACCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGGGCGG 800
GAACATCACCCGCGTGGAGTCAGAAAATAAGGTGGTGATTTTGACTCTT 850
TCGACCCGCTTAGAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAGATATCCGTTCCGGCG 900
GAGATCCTGCGGAAAACCAAGAAATTTCCCGCAGCGATGCCCGTATGGGC 950
GCGCCCGGATTACAACCTCCACTGATAGAGCCCTGGAAAGACCCGGGCT 1000
ACGTGCCTCCGGTGGTACATGGGTGCCCATTGCCACCCACCAAGGCCCT 1050
CCAATACCAACCCCGCGGCGAAAGAGGACAGTTGTCCTGACAGAGTCCAC 1100
CGTATCTTCTGCCTTGGCGGAACTCGCCACGAAGACCTTCGGCAGTTCCG 1150
AATCGTCGGCCGTGCACAGCGGCACGGCGACCGCCCTCCTGACCAGTCC 1200
TCTGACGACGGCGGAGCAGGATCCGACGTTGAGTCGTACTCCTCCATGCC 1250
CCCCCTTGAGGGAGAGCCGGGGGACCCCGATCTCAGCGACGGGTCTTGGT 1300
CTACCGTGAGTGAGGAGGCTGGCGAGGACGTCGTCTGCTGCTCGATGTCT 1350
TACACGTGGACAGGCGCTTTGATTACACCATGCGCTGCGGAGGAGAGCAA 1400
GCTGCCCATCAATGCGCTGAGCAACTTTTGTCTTGCGCCCCATAACATGG 1450
TCTATGCCACAACATCCCGCAGCGCAAGCCAGCGGCAGAAGAAGGTCACT 1500
TTTGACAGGCTGCAAGTCTTGGATGACCACTACCGGGACGTGCTCAAGGA 1550
GATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTCAAGGCTAAACTTCTATCCGTGGAAG 1600

```

Fig. 3A

【图3B】

```

AAGCCTGTAAGCTGACGCCCCCACATTCAGCCAGATCCAAATTTGGCTAT 1650
GGGGCGAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACCACATCCA 1700
CTCCGTGTGGAAGGACTTGCTGGAAGACACTGAGACACCAATTGACACCA 1750
CCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTCTGCGTTCAACCAGAGAAAGGAGGC 1800
CGCAAGCCAGCTCGCCTAATCGTGTACCCAGACTTGGGGGTTGCGGTGTG 1850
CGAGAAAATGGCCCTCTACGACGTGGTCTCCACCCTTCCTCAGGCTGTGA 1900
TGGGCTCCTCATACGGATTCCAGTACTCTCCTGGACAGCGGGTCGAGTTC 1950
CTGGTGAATGCCTGGAAGTCAAAGAAATGCCCTATGGGCTTCGCATATGA 2000
CACCCGCTGTTTCGACTCAACGGTCACCCGAGAATGACATCCGTGTTGAGG 2050
AGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAGACAGGCCATA 2100
AGGTCGCTTACAGAGCGGCTTTATATCGGGGGTCCCCTGACTAACTCAAA 2150
AGGGCAGAGCTGCGGTTATCGCCGGTGCCGTGCGAGCGCGTACTGACGA 2200
CTAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCTGCAGCCTGT 2250
CGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTTGTGTGCGGAGACGACCT 2300
CGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGAACCCAAGAGGACGCGCGAGCCTAC 2350
GAGTCTTCACGGAGGCTATGACTAGGTACTCTGCCCCCCTGGGGACCCG 2400
CCCCAACCAGAATACGACTTGGAGCTAATAACATCATGCTCCTCCAACGT 2450
GTGCGTTCGCGCACGATGCATCTGGCAAAAGGGTATACTACCTCACCCGTG 2500
ACCCACACCACCCCTTGCGCGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACT 2550
CCAGTTAACTCCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCCCACTTTGTG 2600
GGCAAGGATGATTCTGATGACTCACTTCTTTTCCATCCTTCTAGCCCAGG 2650
AGCAACTTGAAAAAGCCCTAGATTGTGAGATCTACGGGGCCCACTACTCC 2700
ATTGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCACGACTCCATGGTCTTAG 2750
CGCGTTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGTGAAATCAATAGGGTGGCTT 2800
CATGCCCTCAGGAAGCTTGGGGTACCACCCTTGCGAGTCTGGAGACATCGG 2850
GCCAGAAGCGTCCGCGCTAAGTTACTGTCCCAGGGGGGGAGGGCTGCCAC 2900
TTGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAGGACCAAGCTTAACTCA 2950
CTCCAATTCGGCTGCGTCCCAGTTGGATTTATCCGGCTGGTTGCTTGCT 3000
GGTTACAGCGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCCCGACCCCG 3050
CTGGTTCATGTGGTGCCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGGCATCTACC 3100
TGCTCCCCAACCGATGA 3117

```

Fig. 3B

【図4】

SGSWLRDVWDWICTVLTDFKTWLQSKLLPRLPGVPFLSCQRGYKGVWRGD	50
GIMQTTCPGGAQIAGHVKNGSMRITGPKTCSNTWHGTFFINTYTTGPCTP	100
SPAPNYSKALWRVAAEEYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKCPCQVPGPEFF	150
TEVDGVRLLHRYAPACKPLLREEVTFQVGLHQYLVGSQLPCEPEPDVTVLT	200
SMLTDPSHITAGAAKRRLARGSPPSLASSSASQLSAPSLKATCTTHHDSF	250
DADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVILDSFDPLRAEEDEREISVPA	300
EILRKTKKFPAAMPVWARPDYNPPLIEPWKDPGYVFPVHGCPLPPTKAP	350
PIPPRRKRRTVVLTESTVSSALAEATKTFGSSSESSAVDSGTATAPDQS	400
SDDGGAGSDVESYSSMPLEGEPPGDPDLSDGSWSTVSEEAGEDVCCSMS	450
YTWTGALITPCAAEESKLPINALSNFLLAPHNMVYATTSSRSASQRQKVT	500
FDRLQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKAKLLSVEEACKLTPPHSARSKFGY	550
GAKDVRNLSSKAVNHIHSVWKDLLEDTEPTIDTTIMAKNEVFVCVQPEKGG	600
RKPARLIVYPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQAVMGSSYGFQYSPGQVFEF	650
LVNAWKSCKCPMGFAYDTRCFDSTVTENDIRVEESIQCCDLAPEARQAI	700
RSALTERLYIGGPLTNSKGQSCGYRRCRASGVLTTSCGNTLTCTYLKASAAC	750
RAAKLQDCTMLVCGDDLVVICESAGTQEDAASLRVFTEAMTRYSAAPPDGP	800
PQPEYDLELITSCSSNVSVAHDAAGKRYYLTRDPTTFLARAAWETARHT	850
PVNSWLGNIIIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQEQLKALDCEIYGAHYS	900
IEPLDLPQIIQRLHGLSAFSLHSYSPGEINRVASCLRKLGVPPPLRVWRHR	950
ARSVRAKLLSQGGRAATCGKYLFWAVRTKLKLTPIPAASQLDLGWFVA	1000
GYSGGDIYHSLSRARPRWFMWCLLLLSVGVGIIYLLPNR*	1038

Fig. 4

【図5A】

```

TCCGGCTCGTGGCTCAGGGATGTCTGGGACTGGATATGCACGGTGTGAC 50
TGACTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGGTTGCCGGGGG 100
TCCCTTTCTCTCGTGTGTCAGCGCGGGTACAAGGGAGTCTGGCGGGGAGAC 150
GGCATCATGCAGACCACCTGCCCATGTGGAGCACAAAATTGCCGGACATGT 200
CAAAAATGGTTCCATGAGGATCACCGGGCTAAAACCTGCAGCAACACGT 250
GGCATGGCACATTCCCCATCAACACATACACCACAGGCCCTGCACACCC 300
TCCCCGGCGCCTAACTACTCCAAGGCGCTGTGGCGGGTGGCCGCTGAGGA 350
GTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCACTACGTAACGGGCATGA 400
CCACTGACAACGTAAAGTGCCCTTGCCAGGTTCCGGCCCCCTGAATTCTTC 450
ACGGAAGTGGATGGGGTGCAGTTGCACAGGTACGCTCCGGCGTGCAAACC 500
CCTCCTACGGGAGGAGGTTACATTCCAGGTCGGGCTCCACCAGTACCTGG 550
TTGGGTCACTACTCCCATGCGAGCCCGAACCAGGATGTGACAGTGCTCACT 600
TCCATGCTCACCAGCCCCCTCCCATCATCAGCAGGGGCGGCTAAGCGTAG 650
GCTGGCCAGAGGCTCTCCCCCTCCCTGGCCAGCTCTTCAGCTAGTCAGT 700
TATCTGCGCCTTCTTGAAGGCAACGTGCACTACCCATCATGACTCCCCA 750
GATGCTGACCTCATGAGGCCAACCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGGGCGG 800
GAACATCACC CGCTGGAGTCAGAAAATAAGGTGGTGATTTTGACTCTT 850
TCGACCCGCTTCGAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAGATATCCGTTCGGCG 900
GAAATCCTGCGGAAAACCAAGAAATTTCCCGCAGCGATGCCCGTATGGGC 950
GCGCCCGGATTACAACCCTCCACTGATAGAGCCCTGGAAAGACCCGGGCT 1000
ACGTGCCTCCGCTGTTACATGGGTGCCCATTGCCACCCACCAAGGCCCT 1050
CCAATACCACCCCGCGGCGAAAGAGGACAGTTGTCTGACAGAGTCCAC 1100
CGTATCTTCTGCCTTGGCGGAACCTCGCCACGAAGACCTTCGGCAGTTCCG 1150
AATCGTCGGCCGTCGACAGCGGCACGGCGACCGCCCCCTCCTGACCAGTCC 1200
TCTGACGACGGCGGCGCAGGATCCGACGTTGAGTCGTACTCCTCCATGCC 1250
CCCCCTTGAGGGAGAGCCGGGGGACCCCGATCTCAGCGACGGGTCTTGGT 1300
TTACCGTGAGTGAGGAGGCTGGCGAGGACGTCGTCTGCTGCTCGATGTCT 1350
TATACGTGGACAGGCGCTCTGATTACACCATGCGCTGCGGAGGAGAGCAA 1400
GCTGCCCATCAATGCGCTGAGCAACTCTTTGCTTGCGCCCCATAACATGG 1450
TCTATGCCACAACATCCCGCAGCGCAAGCCAGCGGCAGAAGAAGGTCACT 1500
TTTGACAGGCTGCAAGTCTGGATGACCACTACCGGGACGTGCTCAAGGA 1550
GATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTCAAGGCTAAACTTCTATCCGTGGAAG 1600

```

Fig. 5A

【図5B】

AAGCCTGTAAGCTGACGCCCCCACATTCAGCCAGATCCAAATTTGGCTAT	1650
GGGGCGAAGGACGTCCGGAACCTATCCAGCAAGGCCGTTAACCACATCCA	1700
CTCCGTGTGGAAGAACTTGCTGGAAGACACTGAGACACCAATTGACACCA	1750
CCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTTCTGCGTTCAACCAGAGAAAAGGAGGC	1800
CGCAAGCCAGCTCGCCTAATCGTGTAACCCAGACTTGGGGGTTGCGGTGTG	1850
CGAGAAAATGGCCCTCTACGACGTGGTCTCCACCCTTCCTCAGGCTGTGA	1900
TGGGCTCCTCATACGGATTCCAGTACTCTCCTGGACAGCGGGTCGAGTTC	1950
CTGGTGAATGCCTGGAAGTCAAAGAAATGCCCTATGGGCTTCGCATATGA	2000
CACCCGCTGTTTTGACTCAACGGTCACCGAGAATGACATCCGTGTTGAGG	2050
AGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAGACAGGCCATA	2100
AGGTCGCTTACAGAGCGGCTTTATATCGGGGGTCCCCCTGACTAACTCAA	2150
AGGGCAGAGCTGCGGTTATCGCCGGTGCCGTGCGAGCGGCGTACTGACGA	2200
CTAGCTGCGGTAATACCCCTCACATGTTACTTGAAGGCCTCTGCAGCCTGT	2250
CGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTTGTGTGCGGAGACGACCT	2300
CGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGAACCCAAGAGGACGCGGCGAGCCTAC	2350
GAGTCTTACGGAGGCTATGACTAGGTACTCTGCCCCCTGGGGACCCG	2400
CCCCAACCAAGAAATACGACTTGGAGCTAATAACATCATGCTCCTCCAACGT	2450
GTCGGTCGCGCACGATGCATCTGGCAAAAGGGTATACTACCTCACCCGTG	2500
ACCCACCAACCCCCCTTGC GCGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACT	2550
CCAGTTAACTCCTGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCCCACTTTGTG	2600
GGCAAGGATGATTCTGATGACTCACTTCTTCTCCATCCTTCTAGCCCAGG	2650
AGCAACTTGAAAAAGCCCTAGATTGTGAGATCTACGGGGCCCACTACTCC	2700
ATTGAGCCACTTGACCTACCTCAGATCATTCAACGACTCCATGGTCTTAG	2750
CGCGTTTTCACTCCACAGTTACTCTCCAGGTGAAATCAATAGGGTGGCTT	2800
CATGCCTCAGGAAGCTTGGGGTACCACCCTTGCGAGTCTGGAGACATCGG	2850
GCCAGAAGCGTCCGCGCTAAATTACTGTCCAGGGGGGAGGGCTGCCAC	2900
TTGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGGGCAGTAAAGACCAAGCTTAAACTCA	2950
CTCCAATTCGGGCTGCGTCCCAGTTGGATTTATCCGGCTGGTTTCGTTGCT	3000
GGTTACAGCGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCCCGACCCCG	3050
CTGGTTCATGTGGTGCCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGGCATCTACC	3100
TGCTCCCCAACCGATGA	3117

Fig. 5B

【図6】

SGSWLRDVWDWICTVLTDFKTWLQSKLLPRLPGVPFLSCQRGYKGVWRGD	50
GIMQTTCPGGAQIAGHVKNGSMRITGPKTCSNTWHGTFPINTYTTGPCTP	100
SPAPNYSKALWRVAAEEYVEVTRVGDFHYVTGMTTDNVKCPCQVPAPPEFF	150
TEVDGVRLLHRYAPACKPLLREEVTFQVGLHQYLVGSQLPCEPEPDVTVLT	200
SMLTDP SHITAGAAKRRLARGSPPSLASSSASQLSAPSLKATCTTHHDSF	250
DADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFDPLRAEEDEREISVPA	300
EILRKTKKFPAAMPVWARPDYNPPLIEPWKDPGYVPPVVHGCPLPPTKAP	350
PIPPRRKRRTVVLTESTVSSALAEATKTFGSSSESAVDSGTATAPDQS	400
SDDGGAGSDVESYSSMPPLEGEPGDPDLSDGSWFTVSEEAGEDVCCSMS	450
YTWTGALITPCAAEESKLPINALSNSLLAPHNMVYATTSSASQRQKKVT	500
FDRLQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKAKLLSVEEACKLTPPHSARSKFGY	550
GAKDVRNLSSKAVNHIHSVWKNLLEDTETPIDTTIMAKNEVFCVQPEKGG	600
RKPARLIVYPDLGVRVCEKMALYDVVSTLPQAVMGSSYGFQYSPGQRFVEF	650
LVNAWKS KCPMGFAYDTRCFDSTVTENDIRVEESIYQCCDLAPEARQAI	700
RSALTERLYIGGPLTNSKGQSCGYRRCRASGVLTTS CGNTLT CYLKASAAC	750
RAAKLQDCTMLVCGDDL VVICESAGTQEDAASLRVFTEAMTRY SAPPGDP	800
PQPEYDLELITSCSSNVSVAH DASGKR VYYLTRDPTT PLARAAWETARHT	850
PVNSWLGNIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAEQLEKALDCEIYGAHYS	900
IEPLDLPQIIQRLHGLSAFSLHSYSPGEINRVASCLRKLGVPPLRVWRHR	950
ARSVRAKLLSQGGRAATCGKYLFWAVKTKLKLTPIPAASQLDL SGWFVA	1000
GYSGGDIYHSLSRARPRWFMWCLLLLSVGVGIIYLLPNR*	1038

Fig. 6

【図7】

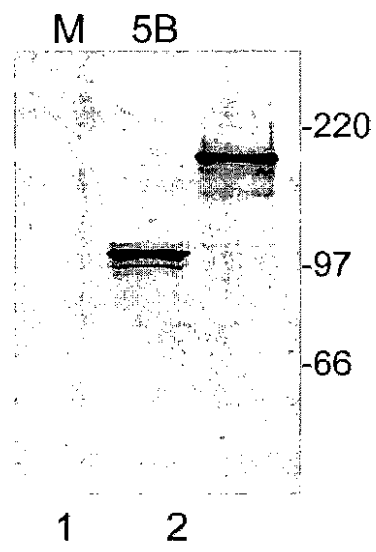


Fig. 7

【図8】

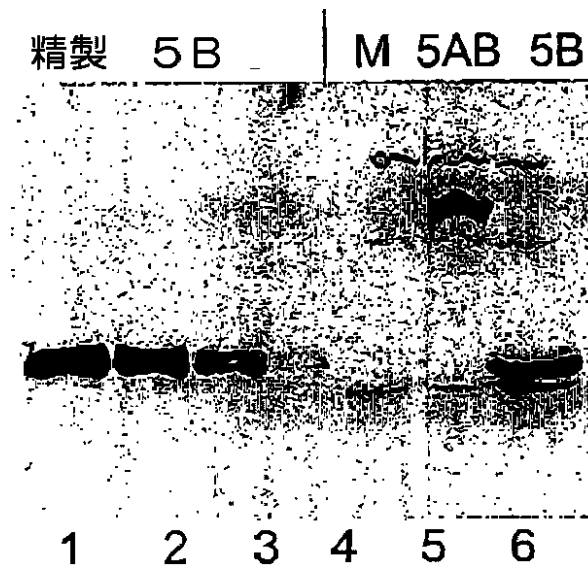


Fig. 8

【図9】

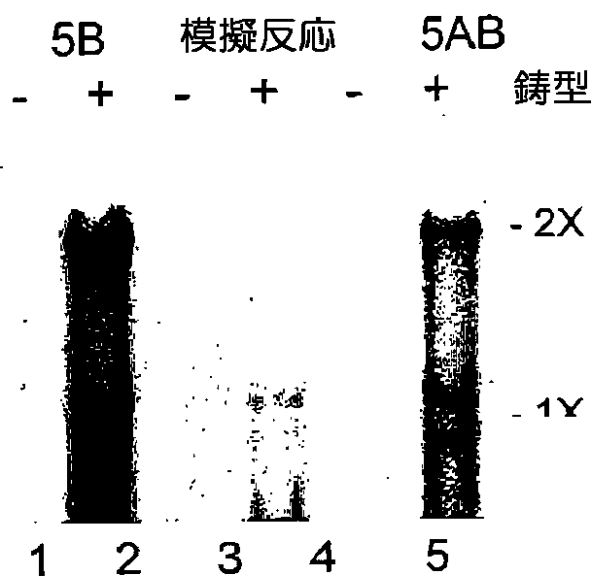


Fig. 9

【図10】

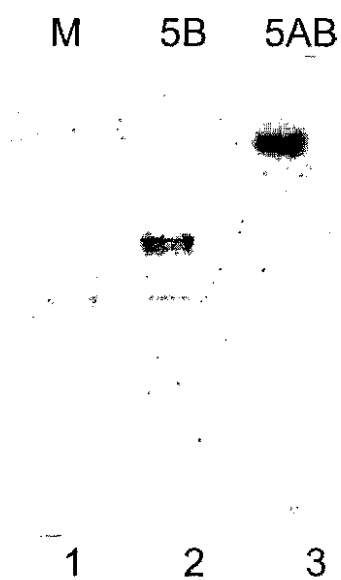


Fig. 10

【図11】

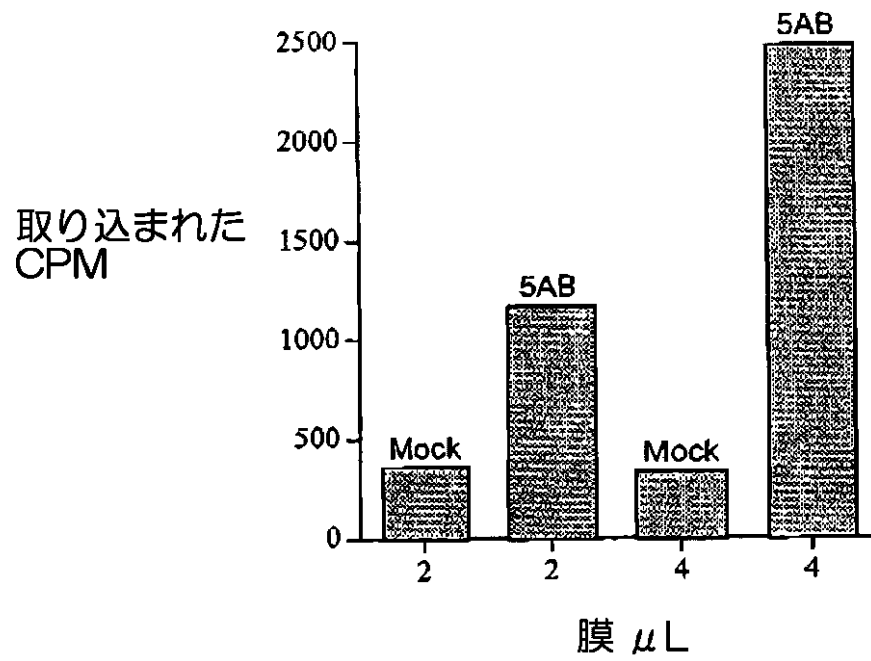


Fig. 11

【図12】

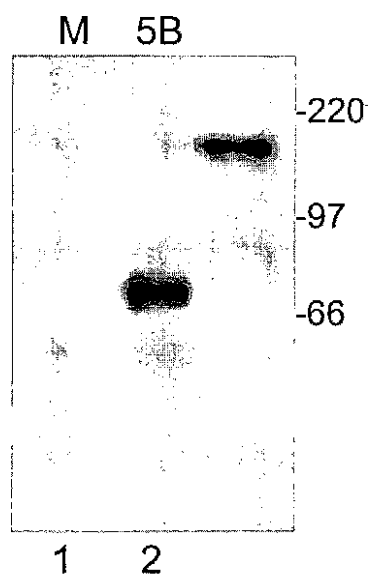


Fig. 12

【図13】

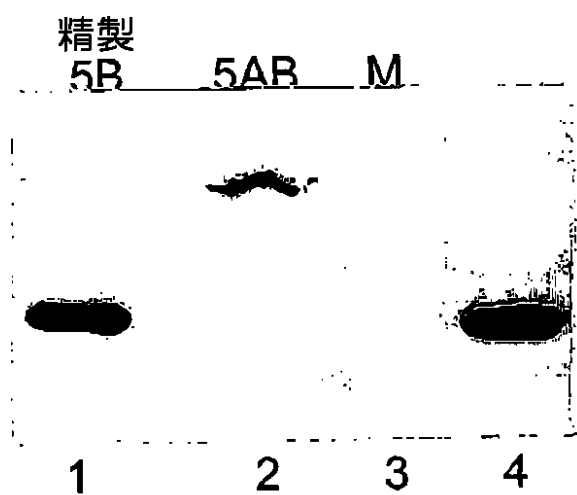


Fig. 13

【図14】

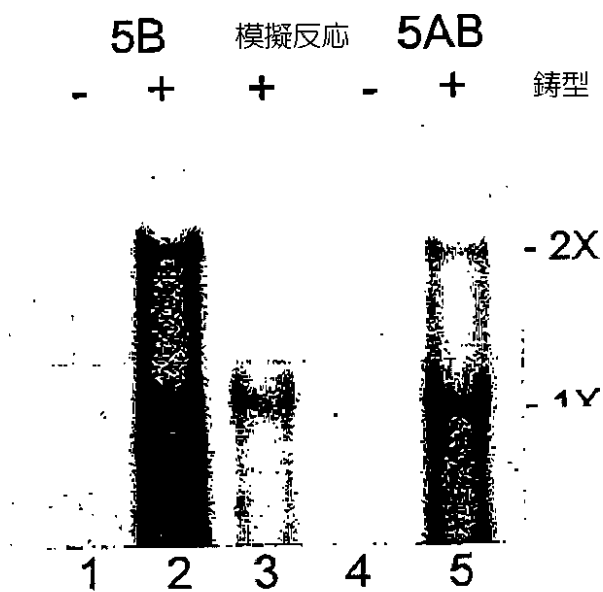


Fig. 14

【図15】

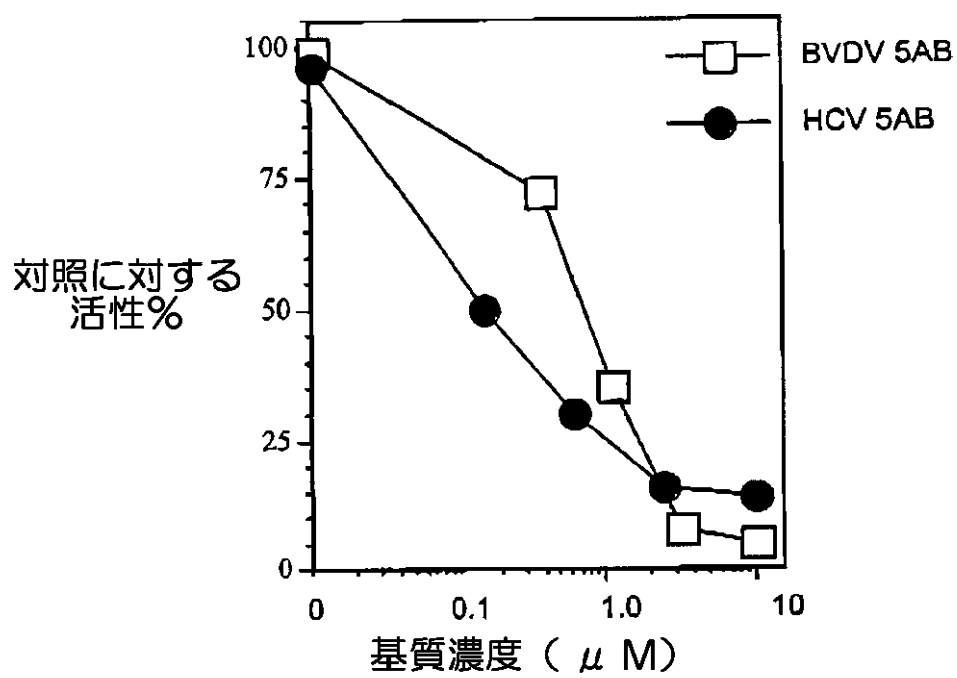


Fig. 15

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/31909
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. 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. : 536/23.2; 435/320.1, 193, 5, 7.5, 15, 325, 456, 32; 424/228.1, 204.1, 93.2; 530/389.4 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) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	X WO 96/37619 A1 (ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S.P.A.) 28 November 1996, see particularly SEQ ID NO:2 and Figure 1.	1, 3, 6, 8, 17, 19-22, 24-28, 30-32, 35-37, 40-43, 49
	X WO 99/55366 A1 (WASHINGTON UNIVERSITY) 04 November 1999, see entire document.	1, 3, 4, 6, 8, 17, 21, 22, 24, 25, 27, 30-32, 35, 40-53
	X TSUTSUMI et al. Detection of Antigens Related to Hepatitis C Virus RNA Encoding the NSS Region in the Livers of Patients with Chronic Type C hepatitis. Hepatology. February 1994. Vol. 19, No. 2, pages 267-272, see entire document.	33, 34, 38, 39, 57, 58
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document 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 26 MARCH 2001		Date of mailing of the international search report 02 MAY 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer TERRY J. DEY MARY E. MOSHER, PARALEGAL SPECIALIST TECHNOLOGY CENTER 1600 Telephone No. (703) 305-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. application No.
PCT/US00/31909

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,739,002 A (DE FRANCESCO et al.) 14 April 1998, see column 3, lines 28-35, column 4, lines 28-33, and column 7, lines 10-21.	1, 3, 6, 8, 17-20
X	WO 99/51781 A1 (VIROPHARMA INCORPORATED) 14 October 1999, see entire document.	1, 3, 6, 8, 17, 19-22, 24-28, 30-53, 55-58
A	SUZUKI et al. Processing and Functions of Hepatitis C Virus Proteins. Intervirology. September 1999. Vol. 42, pages 145-152.	1-58
A	STEFFENS et al. The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. Journal of General Virology. October 1999. Vol. 80, pages 2583-2590.	1-58
A	BARTENSCHLAGER. Candidate Targets for Hepatitis C Virus-Specific Antiviral Therapy. Intervirology. 1997. Vol. 40, pages 378-393.	1-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/31909

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

Please See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/31909

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

C12N 15/51, 15/54, 9/10, 5/10, 15/86; C12Q 1/70, 1/48, 1/18; A61K 39/29, 39/12, 48/00; C07K 16/10

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

536/23.2; 435/320.1, 193, 5, 7.5, 15, 325, 456, 32; 424/228.1, 204.1, 93.2; 530/389.4

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

MEDLINE, DERWENT BIOTECHNOLOGY, EAST USPAT, EPO, JPO, DERWENT. Search terms: NSS, NSSAB, NSSA, NSSB, ANTIBODY, ANTIBODIES, MEMBRANE, FRACTION, MEMBRANES, NS(W)(5 OR 5AB OR 5A5B), VIRUS, VIRUSES, VIRAL, HEPATITIS, SWINE(W)FEVER, BOVINE, DIARRHEA, BORDER, PRECURSOR?, POLYMERASE, C, NSS?, PROBE, PRIMER

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1, 3-29, 35-37, 40-43, 49-53, 55, 56 drawn to NSSAB or variant nucleic acid, protein, and first method of use.

Group II, claim(s) 2, drawn to uncleavable NSSAB.

Group III, claim(s) 30-32, 44-48 drawn to second method of use.

Group IV, claim(s) 33, drawn to third method of use.

Group V, claim(s) 34, 57, 58 drawn to antibody.

Group VI, claim(s) 38-39, drawn to fourth method of use.

Group VII, claim(s) 54, drawn to NSSB + membrane fraction.

The inventions listed as Groups do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The technical feature common to claims 1-53 and 55-58 is an NSSAB protein, or variants or derivatives thereof. The description, on pages 14-17, defines "variants" so broadly as to encompass the processed NSSB protein (for example, NSSB contains about 60% of the sequence of NSSAB, and NSSB retains the NSSAB biological property of polymerase activity). NSSB protein is known in the prior art, see for example WO 96/37619. Therefore, as broadly claimed, the invention lacks a special technical feature which defines it over the prior art.

Claim 54 is drawn to the NSSB protein, which lacks the NSSAB technical feature common to the other claims.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	9/10	4 C 0 8 5
	5/10		9/96	4 H 0 4 5
	9/10	C 1 2 Q	1/02	
	9/96		1/48	Z
C 1 2 Q	1/02		1/68	A
	1/48	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50			M
	33/53		33/566	
			33/569	H
	33/566		33/58	A
	33/569			Z
	33/58	C 1 2 R	1:91	
		C 1 2 N	15/00	A
// (C 1 2 N	5/10		5/00	B
C 1 2 R	1:91)			C
(C 1 2 Q	1/02			
C 1 2 R	1:91)			

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F
, B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W ,
M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G
M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z
, U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z ,
M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M ,
A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B
Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K
, D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E ,
G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J
P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R
, L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K ,
M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R
O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J
, T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z ,
V N , Y U , Z A , Z W

(72)発明者 ジェイムズ・ビー・フラネガン
アメリカ合衆国32606フロリダ州ゲインズ
ビル、ノース・ウエスト・53ストリート
4815番

(72)発明者 スシュマ・オグラム
アメリカ合衆国32605フロリダ州ゲインズ
ビル、ノース・ウエスト・33テラス3736番

- (72)発明者 バーバラ・ジェイ・モラスコ
アメリカ合衆国32601フロリダ州ゲインズ
ビル、ノース・イースト・9 アベニュー
816番
- (72)発明者 リンダ・バローン
アメリカ合衆国19341ペンシルベニア州エ
クストン、ロングウッド・ドライブ410番
- (72)発明者 シウ・チ・チャン・スン
アメリカ合衆国19444ペンシルベニア州ラ
ファイエット・ヒル、ファースト・アベニ
ュー4070番
- (72)発明者 ジェイムズ・エム・グロアーク
アメリカ合衆国19460ペンシルベニア州フ
ェニックスビル、スカーレット・オーク・
ドライブ112番
- (72)発明者 マーク・エス・コレット
アメリカ合衆国19426ペンシルベニア州カ
レッジビル、ジュニパー・コート113番
- F ターム(参考) 2G045 AA25 AA28 AA40 BA13 BB03
BB20 CB01 CB21 DA12 DA13
DA14 DA36 DA77 FB02 FB03
FB04 FB06 FB07
4B024 AA01 AA11 BA10 CA02 CA09
CA11 DA01 DA02 DA05 DA11
EA02 HA14
4B050 CC04 CC07 DD20 LL01 LL03
4B063 QA05 QA18 QA19 QQ13 QQ28
QQ44 QR08 QR55 QR62 QS33
QS34
4B065 AA01 AA57 AA88 AA90 AB01
BA02 CA29 CA44 CA46
4C085 AA03 BA51 BA92 EE01
4H045 AA11 AA30 CA01 DA75 EA29
EA53

专利名称(译)	聚合酶组合物及其使用方法		
公开(公告)号	JP2003514562A	公开(公告)日	2003-04-22
申请号	JP2001539880	申请日	2000-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	维洛药品公司 佛罗里达大学		
申请(专利权)人(译)	Bairofama公司 佛罗里达大学		
[标]发明人	ジェイムズビーフラネガン スシュマオグラム バーバラジェイモラスコ リンダバローン シウチチャンスン ジェイムズエムグロアーク マークエスコレット		
发明人	ジェイムズ・ビー・フラネガン スシュマ・オグラム バーバラ・ジェイ・モラスコ リンダ・バローン シウ・チ・チャン・スン ジェイムズ・エム・グロアーク マーク・エス・コレット		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 A61K39/12 A61P31/14 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/10 C12N9/12 C12N9/96 C12N15/09 C12N15/51 C12N15/54 C12Q1/02 C12Q1/18 C12Q1/48 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/58		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K39/00 A61P31/14 C07K2319/00 C12N9/127 C12Q1/18 G01N33/56983 G01N2333/005 G01N2333/18		
FI分类号	A61K39/12 A61P31/14 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/21 C12N9/10 C12N9/96 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.H G01N33/58.A G01N33/58.Z C12R1/91 C12N15/00.A C12N5/00.B C12N5/00.C		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA28 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 2G045/FB06 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/HA14 4B050/CC04 4B050/CC07 4B050/DD20 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ13 4B063/QQ28 4B063/QQ44 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS33 4B063/QS34 4B065/AA01 4B065/AA57 4B065/AA88 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA51 4C085/BA92 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA01 4H045/DA75 4H045/EA29 4H045/EA53		
优先权	60/167068 1999-11-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了涉及针对病毒RNA的RNA聚合酶蛋白的组合物和方法。

