

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4820991号
(P4820991)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/19
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 8 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2005-334549 (P2005-334549)	(73) 特許権者	504171134
(22) 出願日	平成17年11月18日(2005.11.18)		国立大学法人 筑波大学
(65) 公開番号	特開2007-135487 (P2007-135487A)		茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(43) 公開日	平成19年6月7日(2007.6.7)	(74) 代理人	100103218
審査請求日	平成20年10月23日(2008.10.23)		弁理士 牧村 浩次
		(74) 代理人	100110917
			弁理士 鈴木 亨
		(74) 代理人	100115392
			弁理士 八本 佳子
		(72) 発明者	永田 恭介
			茨城県つくば市天王台一丁目1番1号 国立大学法人筑波大学内
		(72) 発明者	内藤 忠相
			茨城県つくば市天王台一丁目1番1号 国立大学法人筑波大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母細胞を用いたインフルエンザウイルスゲノムの複製・転写系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インフルエンザウイルス粒子より精製したウイルスRNA-ウイルスRNAポリメラーゼ-ヌクレオカプシドタンパク質複合体(vRNP)を酵母細胞に導入することにより、該酵母細胞でそのインフルエンザウイルスRNAゲノムの複製・転写を行わせることを特徴とする、インフルエンザウイルスの酵母内ゲノム複製系の作成方法。

【請求項2】

前記の導入が、酵母のスフェロプラストを調製し、ポリエチレングリコールの存在下で、精製したvRNPを混合することによる、請求項1に記載の作成方法。

【請求項3】

外来レポーター遺伝子を組込んだモデルインフルエンザウイルスRNAゲノムと、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼおよびヌクレオカプシドタンパク質の発現用ベクターを酵母細胞に導入することにより、当該モデルインフルエンザウイルスRNAゲノムの複製およびその遺伝子の発現を該酵母細胞内で行わせることを特徴とする、インフルエンザウイルスの酵母内ゲノム複製系の作成方法。

【請求項4】

酵母細胞、インフルエンザウイルス粒子より精製したウイルスRNA-ウイルスRNAポリメラーゼ-ヌクレオカプシドタンパク質複合体(vRNP)、酵母細胞スフェロプラスト調製用の試薬類、トランスフェクション用試薬類、インフルエンザウイルスタンパク質発現用ベクターを少なくとも含む、インフルエンザウイルスゲノム複製系を作成するためのキット。

【請求項5】

請求項1～3のいずれかに記載の方法で作成されたインフルエンザウイルスの酵母内ゲノム複製系を用いる、インフルエンザウイルスRNAゲノムの複製と転写に関わる宿主因子のスクリーニング方法。

【請求項6】

請求項1～3のいずれかに記載の方法で作成されたインフルエンザウイルスの酵母内ゲノム複製系を用いる、インフルエンザウイルスRNAゲノムの複製活性または転写活性、ウイルス因子-宿主因子の相互作用、あるいは宿主因子のウイルス増殖促進作用を作用の標的とする、抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法。

【請求項7】

外来レポーター遺伝子を組込んだモデルインフルエンザウイルスRNAゲノム、インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼおよびヌクレオカプシドタンパク質の発現用ベクター、酵母細胞、酵母細胞スフェロプラスト調製用の試薬類、トランスフェクション用試薬類を少なくとも含む、インフルエンザウイルスRNAゲノム内に組み込まれた外来レポーター遺伝子の発現を測定することにより、酵母内インフルエンザウイルスゲノムの複製活性または転写活性、ウイルス因子-宿主因子の相互作用、あるいは宿主因子のウイルス増殖促進作用に影響を及ぼす抗インフルエンザウイルス候補物質の作用を調べるためのキット。

【請求項8】

請求項1～3のいずれかに記載の酵母内ゲノム複製系の作成方法において作成された、酵母にインフルエンザウイルスRNAゲノムが導入され、形質転換された酵母形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵母細胞を用いたインフルエンザウイルスゲノムの複製・転写系に関する。より詳しくは、インフルエンザウイルスのマイナス鎖RNAゲノムからの転写・複製を酵母細胞において発現する系に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザウイルスはヒトやトリを含むさまざまな動物に感染する。ウイルスが増殖するためには、宿主となる動物内に侵入し、細胞に感染する必要がある。そして、細胞内に侵入したウイルスは、増殖のためウイルス性因子に加えて、細胞内小器官を含めた多くの宿主因子の機能を利用する。よって、ウイルスゲノムの複製機構や病原性の分子機構を理解するためには、それらの機能に関与する宿主因子を同定し、解析することが重要である。

【0003】

DNAウイルスにおいては、ウイルスゲノムをDNAとして簡易に細胞内に導入することができたため、転写・複製の分子機構が詳細に解析され、また多くの宿主因子がその機能に関与することが示されてきた。さらにそれら宿主因子の解析は、宿主細胞ゲノムの転写・複製機構の解析にも寄与し、生物学の発展に貢献してきた。また、RNAウイルスのなかでも、ゲノムをプラス鎖RNAとしてもつウイルスは、そのRNAゲノムのみで感染性をもつことがわかっている（非特許文献1参照）。よって、試験管内で合成したウイルスゲノムRNAを細胞に導入すれば、それらウイルスゲノムから転写・複製が起こる。DNAウイルスと同様に、プラス鎖RNAウイルスも、再構成したウイルスRNAゲノムを細胞内に導入し、ウイルス増殖過程を解析できたことから、転写・複製などの分子機構が明らかとなり、それに伴い必要な宿主因子が同定されてきている（例えば非特許文献2、3および4を参照）。

【0004】

しかし、インフルエンザウイルスを含めたマイナス鎖RNAをゲノムとしてもつRNAウイルスは、そのRNAゲノムのみを細胞に導入しても感染性を示さない。マイナス鎖のRNAゲノムからの転写・複製にはウイルス由来のRNA依存性RNAポリメラーゼが必要である。そのため、RNAゲノムは、該ウイルスポリメラーゼなどとウイルスRNA-タンパク質複合体(vRNP: vi

10

20

30

40

50

ral RNA-viral RNA polymerase-nucleocapcid protein complex)を形成することで感染性をもつ。よって、再構成したゲノムRNAを細胞内で機能させるためには、vRNPとしてか、または同時にウイルスポリメラーゼなどの転写・複製に必要なウイルス性因子を発現させなければならない(例えば非特許文献5および6を参照)。よって、マイナス鎖RNAウイルスにおいて、再構成したゲノムRNAを用いた細胞内での解析は他のウイルスよりも遅れていた。

【0005】

近年、インフルエンザウイルスにおいてリバーシジェネティクスシステムが確立され、ウイルスゲノムの転写・複製や病原性の解析が盛んに行われている(例えば非特許文献7)。しかし、それらはウイルス性因子を標的とした解析がほとんどで、宿主因子の機能解析を行っている例は少ない。また、現在の系では機能的な宿主因子を同定することも困難である。そのため、インフルエンザウイルス増殖に関与する未知の宿主因子を同定できる新たな系の開発が望まれている。

【非特許文献1】Neumann G ら、J Gen Virol, Vol.83, p2635-2662 (2002)

【非特許文献2】Kushmer D.B ら、Proc Natl Acad Sci USA, Vol.100, p15764-15769 (2003)

【非特許文献3】Panavas T ら、Proc Natl Acad Sci USA, Vol.102, p7326-7331 (2005)

【非特許文献4】Ahlquist P ら、J Virol, Vol.77, p8181-8186 (2003)

【非特許文献5】Luytjes W ら、Cell, Vol.59, p1107-1113 (1989)

【非特許文献6】Yamanaka K ら、Proc Natl Acad Sci USA, Vol.88, p5369-5373 (1991)

【非特許文献7】Neumann G ら、Proc Natl Acad Sci USA, Vol.96, p9345-9350 (1990)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

これまで、インフルエンザウイルスが酵母細胞内でそのゲノムが複製することは確認されていなかった。しかし、豊富な遺伝情報が蓄積された酵母細胞内で、ウイルスゲノムの複製、ウイルス遺伝子の転写、ウイルスタンパク質の発現が可能となれば、インフルエンザウイルスの感染、宿主でのその増殖、病原性に関わる特異的な宿主細胞因子を同定することができ、抗インフルエンザウイルス剤の開発に必須のツール、手法を提供できる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

今回、本発明者は酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)にインフルエンザウイルス粒子より精製したvRNPを導入することにより、酵母内でウイルスRNAゲノムからの転写・複製反応を起こさせることに初めて成功した。次に上記課題を解決するための手段として、本発明の構成を示す。

【0008】

本発明である、マイナス鎖ウイルスの酵母内ゲノム複製系の作成方法は、マイナス鎖RNAウイルス粒子より精製したウイルスRNAゲノム-ウイルスタンパク質複合体(vRNP)を酵母細胞に導入することにより、そのマイナス鎖RNAゲノムを該酵母細胞で複製・転写を行わせることを特徴としている。

【0009】

前記マイナス鎖RNAウイルスが、好ましくはインフルエンザウイルスである。

前記の導入は、酵母のスフェロプラストを調製し、ポリエチレングリコールの存在下で、精製したvRNPを混合することによる。

【0010】

また、本発明は外来レポーター遺伝子を組込んだインフルエンザウイルスRNAゲノムを酵母細胞に導入し、遺伝子の複製と発現を該酵母細胞内で行わせることを可能としたインフルエンザウイルスゲノム複製系の作成方法である。

【0011】

10

20

30

40

50

本発明のキットは、酵母細胞、精製インフルエンザウイルスvRNP、酵母細胞スフェロプラスト調製用の試薬類、トランスフェクション用試薬類、インフルエンザウイルスタンパク質発現用ベクターを少なくとも含む、インフルエンザウイルスゲノム複製系を作成するためのキットである。

【0012】

また、本発明のスクリーニング方法は、前記の方法で作成されたマイナス鎖ウイルスの酵母内ゲノム複製系を用いる、マイナス鎖RNAウイルスのウイルス因子および宿主因子のスクリーニング方法である。

【0013】

特に前記の方法で作成されたインフルエンザウイルスの酵母内ゲノム複製系を用いる、インフルエンザウイルスゲノムの複製と転写に関わる宿主因子のスクリーニング方法である。

10

【0014】

さらに、前記の方法で作成されたインフルエンザウイルスの酵母内ゲノム複製系を用いて、ウイルスゲノムの複製と転写を作用の標的とする、抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法、ならびにウイルス因子-宿主因子の相互作用を標的とする、抗ウイルス剤のスクリーニング方法も本発明に含まれる。

【0015】

本発明の別態様のキットとして、インフルエンザウイルスRNAゲノム内に組み込まれた外来レポーター遺伝子の発現を測定することにより、インフルエンザウイルスの酵母内ゲノムの複製活性または転写活性、ウイルス因子-宿主因子の相互作用、あるいは宿主因子のウイルス増殖促進作用に影響を及ぼす抗インフルエンザウイルス候補物質の作用を調べるためのキットがある。

20

【0016】

酵母にマイナス鎖RNAウイルスゲノムが導入されて形質転換された酵母形質転換体も本発明に含まれる。

【発明の効果】

【0017】

真核細胞のモデル生物と位置づけられている酵母は、遺伝学的解析が行えることから、ウイルスゲノム複製を促進または抑制する変異株の取得も容易であり、網羅的な宿主因子の同定が可能であると考えられる。プラス鎖RNAウイルスであるプロモモザイクウイルスなどでは、酵母内ウイルスゲノム複製系が確立されており^{20, 21}、数多くのウイルス因子および宿主因子⁶が決定されている。しかし、インフルエンザウイルスについて、酵母内でウイルスゲノム複製系を確立した例はなく、今回初めてその可能性を示した。

30

【0018】

そして、この系をさらに発展させ、酵母内でインフルエンザウイルスの転写・複製活性をレポーター遺伝子の発現により測定できる系を構築できれば、ウイルスゲノム複製を担うウイルスポリメラーゼを標的とした新たな抗ウイルス剤のスクリーニングも可能である。また、ウイルスタンパク質の変異が転写・複製に及ぼす影響も簡単に検出することができ、多くの応用が期待できる。

40

【0019】

[発明の詳細な説明]

本明細書で使用している用語と表現はあくまで説明上のものであって、限定的なものではない。使用される遺伝子工学上の用語、例えば「トランスフェクション、トランスフェクト」、さらに「ウイルス因子」、「宿主因子」、「プラス鎖」および「マイナス鎖」などの意味は、通常、当業者が認識している定義と同一である。

【0020】

ウイルスゲノムの「感染性(infectious)」⁶⁻⁹とは、細胞内にウイルスゲノム(遺伝子工学的に操作されたものも含む)が導入されたとき、そのゲノムの複製および転写について導入されたウイルスゲノムが活性であることをいう。

50

【 0 0 2 1 】

ウイルスの複製には、ウイルス因子を必要とし、また宿主細胞の機能および装置にごとく負うものである。したがって宿主側の機能および装置として関わる宿主因子の同定は、ウイルスの複製および病原性の分子的機構を明らかにするために極めて重要である。そのような研究はDNAウイルスにおいて先行し、プラス鎖RNAウイルスの場合にもそのRNAゲノムは「感染性」であり、同様に追求が進んだ⁶⁻⁹。これに対してマイナス鎖RNAウイルスのゲノムRNAは感染性はなく、ピリオンから単離されたvRNP複合体が感染性を示す¹⁰。よって、細胞内において簡易にマイナス鎖RNAゲノムからの複製を再現させることはできず解析が遅れている。

【 0 0 2 2 】

インフルエンザウイルスは、8本に分節化された1本鎖マイナス鎖RNAをゲノムとして持っている。インフルエンザウイルスのRNAゲノムは、PB1、PB2およびPAサブユニットからなるRNA依存性RNAポリメラーゼおよび核タンパク質(NP) (これらは「ウイルス因子」である) に結合して、ウイルスRNA-タンパク質複合体(vRNP)を形成する¹¹。このvRNPが、ウイルスゲノムの転写および複製に必要な基本構造体である。

【 0 0 2 3 】

本発明であるマイナス鎖RNAウイルスの酵母内ゲノム複製系の作成方法は、マイナス鎖RNAウイルス粒子より精製したウイルスRNA-ウイルスタンパク質複合体(vRNP)を酵母細胞に導入することにより、そのマイナス鎖RNAゲノムを該酵母細胞で転写・複製を行わせることを特徴としている。

【 0 0 2 4 】

本発明方法の詳細は、「発明を実施するための最良の形態」欄に記載されている。このように確立されたマイナス鎖RNAウイルスの酵母内ゲノム複製系を使用することにより、ウイルスゲノムの発現によるウイルス増殖や病原性に関わる宿主細胞側の因子の同定と機能の解明などに関する研究が一層進み、これにより集積された知見を基に効率的な抗ウイルス剤の開発が促進される。

【 0 0 2 5 】

好ましくは前記マイナス鎖RNAウイルスがインフルエンザウイルスである。インフルエンザウイルスは、遺伝的変容が速く、新興または再興の種が出現しやすく、現在も有効なインフルエンザワクチンの製造を困難にしている。インフルエンザワクチン、抗インフルエンザ剤の開発を支援するインフルエンザウイルスゲノムの操作技術の確立が一刻も早く求められている。

【 0 0 2 6 】

__宿主として動植物細胞などの細胞(例えば培養細胞)も可能であるが、特に哺乳動物培養細胞系では、遺伝学的な手法に制限がある。これに対して培養が容易で、しかも増殖速度が、動物細胞に比べてはるかに速い酵母細胞が最適である。なぜならば酵母細胞は、変異株、亜種も含めて多種多様な株として容易に入手でき、その特性などが詳細に明らかにされているからである。真核細胞のモデル生物と位置づけられている酵母は、ゲノムの全解析が済んでその塩基配列が明らかであり、これらの遺伝的情報に基づいて遺伝学的解析が行える。ウイルスゲノム複製を促進または抑制する変異株の取得も容易であり、網羅的な宿主因子の同定が可能である。以上より酵母細胞系を用いた形質を指標にする系統的で、かつ網羅的なスクリーニングは、手間、コストの点からも他の細胞系よりはるかに優位に立つ。

【 0 0 2 7 】

本発明に使用される酵母の種類は特に限定されない。また各種の酵母変異株も必要に応じて用いてもよい。特に入手が容易で特性が知られている、*Saccharomyces cerevisiae* が望ましい。

【 0 0 2 8 】

酵母細胞へのvRNPの導入は、外来遺伝子を細胞に導入するトランスフェクションとして知られた方法により可能である。例えば、酢酸リチウム法、エレクトロポレーション法

10

20

30

40

50

などが挙げられる。より望ましい方法として、酵母のスフェロプラストを調製し、ポリエチレングリコールの存在下で、ピリオンから精製したvRNPを混合するのがよい。

【0029】

さらに本発明は、外来レポーター遺伝子を組込んだインフルエンザウイルスRNAゲノムを酵母細胞に導入し、遺伝子の複製と発現を該酵母細胞内で行わせることを可能としたインフルエンザウイルスゲノム複製系の作成方法、も含まれる。この方法においては、インフルエンザウイルスゲノムの遺伝子発現制御部分を残し、オープンリーディングフレーム部分をレポーター遺伝子に置き換えたモデルウイルスゲノムを酵母に導入して、このモデルウイルスゲノムの複製とレポーター遺伝子の転写と発現を行うことができる系が作成される。

10

【0030】

レポーター遺伝子として、例えばウイルスゲノム複製の活性または転写調節活性を測定することができるような、酵母ゲノムにおいて外来であり、その発現が容易に測定できる遺伝子が選択される。

【0031】

あるいは、網羅的に変異を導入した酵母においてもレポーター遺伝子の活性を指標に、ウイルスゲノムの複製活性に影響する酵母変異株の取得にも利用することができる。変異の原因遺伝子を相補試験により決定することで、ウイルスゲノムの複製に関与する宿主因子を同定することができる。

【0032】

指標を与える形質を新たに導入するためのレポーター遺伝子として、好適にはルシフェラーゼ遺伝子、酵母栄養要求性マーカー遺伝子(URA3、LYS2、TRP1、HIS3、LUE2)、または薬剤耐性遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子)などが例示される。ウイルスゲノムのオープンリーディングフレーム部分をレポーター遺伝子に置き換えることは、公知技術によっておこなうことができる。

20

【0033】

本発明のキットは、酵母細胞、精製インフルエンザウイルスvRNP、酵母細胞スフェロプラスト調製用の試薬類、トランスフェクション用試薬類、インフルエンザウイルスタンパク質発現用ベクターを少なくとも含む、インフルエンザウイルスゲノム複製系を作成するためのキットである。

30

【0034】

本発明のキットには、上記方法を実施するために必要とされる各種資材および推奨プロトコルを記載した説明書などが含まれる。具体的には酵母細胞スフェロプラスト調製用の試薬類、トランスフェクションを実施するための試薬類および/または遺伝子増幅を実施するためのプライマー類、試薬を含むキットを提供する。

【0035】

このようなキットは、さらに必要に応じて他の試薬類、材料などの組み合わせの態様であってもよい。例えば、ピリオンからインフルエンザウイルスvRNPを分離するために使用される試薬類、およびマイクロタイタープレート、PCR用具などの器材一式などをキット要素とすることもできる。これらの試薬の中には、プライマー、各種酵素類、緩衝液、洗浄液、溶解液なども含まれる。

40

【0036】

かかるキットにより、多数の試薬、機材などを取り扱う煩雑さからも解放され、処理・分析・解析の迅速化、簡便化を図ることができる。

本発明のさらなる方法として

前記の方法で作成されたマイナス鎖RNAウイルスの酵母内ゲノム複製系を用いて、マイナス鎖RNAウイルスのウイルス因子と宿主因子の相互作用を探索するスクリーニング方法がある。さらに、宿主因子とウイルス因子との相互作用を標的とする化合物を見出せば、ウイルスの複製に影響を及ぼし、抗ウイルス剤の有力な候補物質となる可能性がある。そうした化合物探索のためのスクリーニング方法も本発明に含まれる。

50

【 0 0 3 7 】

宿主細胞に感染したインフルエンザウイルスは、まずそのゲノムRNA（マイナス鎖）を相補的なプラス鎖に転写し、合成されたmRNAを利用してウイルスタンパク質が作られる。ゲノムRNAを転写する酵素、ウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼは宿主細胞には存在しない。その酵素はウイルスゲノムにコードされ、予め、ウイルス粒子の中でゲノムRNAに結合して存在し、感染によりウイルスゲノムとともに細胞内に侵入し、感染直後の「転写」を行っている。一方、マイナス鎖RNAゲノムからは、完全に相補的なプラス鎖RNA(cRNA)を経由して、子孫ウイルスのマイナス鎖RNAが合成される。上記RNAポリメラーゼは、この一連の「複製」過程にも関与している。細胞の中には多種類の細胞性RNAがあるにも関わらず、感染細胞では、ウイルスRNAだけが転写され、複製されるので、ウイルスRNAポリメラーゼは、細胞のRNAと、ウイルスのRNAを区別しているに違いない。このようにウイルスゲノムの複製と転写に関わる中心的な酵素はウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼである。しかし、それだけでは足りず、十分な複製と転写には、それらの反応の場である感染細胞の核や、または細胞質に存在する宿主因子の助けが必要であると考えられる。

10

【 0 0 3 8 】

例えば、インフルエンザウイルスゲノムの転写・複製を促進することが明らかになっている宿主因子、RAF-2p48の酵母ホモログである、SUB2欠損変異株を用いる実験から、ウイルスゲノムの複製低下が観察された。このことから酵母内インフルエンザウイルス複製系が宿主因子の機能により影響を受けていることが示唆される。

【 0 0 3 9 】

感染細胞内では、様々な宿主因子がウイルス増殖を助けていると考えられているが、感染の種特異性、病原性にも宿主因子の関与が推測されている。

以上より、特にインフルエンザウイルスの場合、前記の方法で作成されたインフルエンザウイルスの酵母内ゲノム複製系を用いる、ウイルスゲノムの複製と転写に関わる宿主因子のスクリーニング方法が、ウイルスゲノム機能にかかわる宿主因子の探索と解明に必要である。そうした宿主因子の同定および機能の解析は、改良型抗ウイルス剤、あるいは新たな概念に基づく次世代型の抗ウイルス剤の開発に多大な貢献をすると期待される。

20

【 0 0 4 0 】

さらに、抗インフルエンザウイルス剤の開発には、前記の方法で作成されたインフルエンザウイルスの酵母内ゲノム複製系を用いて、インフルエンザウイルスゲノムの複製と転写を作用の標的とする、スクリーニング方法も有益である。具体的には酵母内でインフルエンザウイルスゲノムの転写・複製活性をレポーター遺伝子の発現により測定できる系を構築できれば、ウイルスゲノムの複製を担うRNA依存性RNAポリメラーゼを標的とした新たな抗ウイルス剤のスクリーニングも可能である。抗インフルエンザウイルス剤のスクリーニング方法として、ウイルス因子 - 宿主因子の相互作用を標的とする態様であってもよい。本発明により酵母細胞内におけるインフルエンザウイルスゲノム複製系が確立されたので、酵母の遺伝学的情報を基に、網羅的にまたは簡便に上記スクリーニングが実施できる。このため培養細胞を用いた従来のスクリーニング系に比べると、煩雑でなく効率的であり、かつ、高コストを解消できる。

30

【 0 0 4 1 】

本発明の別態様であるキットとして、インフルエンザウイルスRNAゲノム内に組込まれた外来レポーター遺伝子の発現を測定することにより、酵母内ウイルスゲノムの複製活性または転写活性、ウイルス因子 - 宿主因子の相互作用、あるいは宿主因子によりウイルス増殖促進作用に影響を及ぼす抗インフルエンザウイルス候補物質の作用を調べるためのキットもまた、上記スクリーニングの実施に有用である。そのために必要な材料、試薬、プロトコルなどが一セットとして含まれる。

40

【 0 0 4 2 】

酵母細胞にマイナス鎖RNAウイルスゲノムが導入されて形質転換された酵母形質転換体も本発明に含まれる。そうしたマイナス鎖RNAウイルスゲノムとして、例えばインフルエンザウイルスゲノムがあり、あるいは外来レポーター遺伝子が組込まれたマイナス鎖RNA

50

ゲノムでもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

方法1

・酵母株と酵母細胞中へのDNA、RNAおよびvRNPの導入

酵母株YPH499(MATa、ura3-52、lys2-801、ade2-101、trp1-63、his3-200、leu2-1)がすべての実験において使用された。SUB2欠損株は、SUB2オープンリーディングフレーム全体を、TRP1 (SUB2D::TRP1フラグメント) で置換することにより取得した。酵母細胞をプラスミドDNAで形質転換するために、酢酸リチウム-ポリエチレングリコール法が使用された。RNAおよびvRNPの導入は、RNA形質転換について記載された操作に基づき、若干の変更を加えて実施された(方法2の項参照)。

10

【0044】

・全RNA抽出とRT-PCR

酵母細胞から全RNAの抽出は、方法2の項に記載したようにして行なわれた。インフルエンザウイルスRNA(vRNA、cRNAおよびmRNA)、細胞内mRNA(ACT1、ADH1およびSUB2)およびrRNA(RDN25-1)の検出のために、リバーストランスクリプターゼ(TOYOBO)および特異的プライマーを用いて、cDNAが合成された。本研究に使用されたすべてのプライマーの配列が、表1~3にまとめられている。cDNAは、Taq DNAポリメラーゼ(NEB)およびプライマーセットを用いるPCRにかけられた。増幅された2本鎖DNAは、7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離され、臭化エチジウムにより可視化された。

20

【0045】

・間接蛍光抗体法

酵母細胞の間接蛍光抗体法が、抗NP抗体を使用し、以前の文献に記載されたように²²、実施された。DNAは、DAPI染色によって可視化された。

【0046】

・vRNP複合体およびセグメント5 vRNA欠損vRNP複合体の調製

本明細書におけるすべてのウイルスの供給は、インフルエンザA/プエルトリコ/8/34(PR/8)ウイルスに由来する。ピリオンの精製およびそれからのvRNP複合体の単離は既に記載されたようにして行なった²³。セグメント5 vRNAを欠損するvRNPを調製するために、10 mlのvRNA(10 mlに1 mgのNPを含有する)が、5 M NaCl 0.6 ml、セグメント5 vRNAの一部に相補的なオリゴヌクレオチド(Segment 5 digestion: 表5より)100 ngの存在下で、37、5分間、インキュベートされた。次いで混合物は12.5 mM Tris-HCl (pH 7.9) (5 mM MgCl₂および1.25 mM Dithiothreitolを含有)、40 mlを添加することにより希釈した。30 UのRNase H(TaKaRa)が添加され、反応混合物はさらに37、5分間インキュベートされた。反応中のオリゴヌクレオチドは、4 UのRQ DNase I(Invitrogen)を用いて、25 UのRNase阻害剤(TOYOBO)の存在下で、37、10分間、完全に消化された。

30

【0047】

・T7 RNAポリメラーゼを用いるin vitro RNA合成

T7 RNAポリメラーゼによるin vitro転写のためのDNA鋳型を構築するために、yEGFP(酵母内の遺伝子発現に最適化されたコドンに改変した緑色蛍光タンパク質)遺伝子を含むDNAフラグメント(非構造タンパク質(NS)をコードする、インフルエンザAウイルス(PR/8)セグメント8 vRNAの5'-末端配列および3'-末端配列で挟まれる)は、プライマーとして、NS-yEGFP-FOR NS-yEGFP-REV、鋳型にpRG01(yEGFPをコードする)を用いるPCRによって増幅された。増幅されたフラグメントはNS-yEGFP DNAと名づけた。T7プロモーター配列を付加するために、プライマーセットとして、T7 vNS-FORおよびyNS-REVあるいはT7 cNS-FORおよびcNS-REVのいずれかを用いて、鋳型にNS-yEGFP DNAフラグメントを使用し、PCRにより伸長が実施された。vNS-yEGFPおよびcNS-yEGFP RNAは、T7 RNAポリメラーゼ(TaKaRa)および増幅DNAフラグメントを含む転写反応において合成された。

40

【0048】

・ウェスタンブロッティング分析

50

対数増殖している酵母細胞を低速度遠心分離により回収し、0.9% NaClで2回洗浄した。細胞は、Zymolyase-100T (生化学工業), 100 mg/ml を含有する緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、1 M Sorbitol、3 mM Dithiothreitol)に懸濁した。時折攪拌しながら、30 分で60分間インキュベートした。低速度遠心分離によりスフェロプラストを回収し、細胞溶解緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.1% NP-40、7 M Urea)に再懸濁し、超音波処理により細胞溶解を行なった。細胞溶解液は遠心分離により残渣を除き、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)、次いで抗ウイルスタンパク質抗体を用いるウェスタンブロッティング法を実施した(抗体の調製方法は、方法2の項参照)。

【0049】

・ *in vitro*インフルエンザウイルスRNA合成

*in vitro*インフルエンザウイルスRNA合成を、以前の文献の方法に従った¹³。簡単に記すと、50 mM HEPES-NaOH (pH7.9)、3 mM MgCl₂、50 mM KCl、1.5 mM Dithiothreitol、ATP、CTP、UTPの各500 mM、25 mMのGTP、5 mCiの[α-³²P] GTP(3,000 Ci/mole)、4 UのRNase阻害剤、250 mMのApGジヌクレオチド、10 ngの53ヌクレオチド長のマイナス鎖モデルRNA鋳型(53 merVwt: 表5より)ならびに酵素源としてvRNP(10 ngのNPを含有する)を含有する最終容量25 mlで、37 °C、60分間、RNA合成が実施された。RNA生成物は、尿素(8 M)変性10% PAGEを通す分離にかけ、オートラジオグラフィーにより可視化された。

【0050】

方法2

・ 酵母の株および培養条件

すべての実験で酵母株YPH499(MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-63, his3-200, leu2-1)を使用した。酵母細胞はアデニンを含有する酵母抽出液 - ペプトン - デキストロース培地(YPDA)において、30 °Cで増殖させた。ガラクトースにより誘導されるタンパク質発現のために、単一のコロニーをまず2%グルコースを含む合成限定(SD)培地へ植えた。酵母細胞は、610 nmでの光学密度(OD₆₁₀)が0.6-0.8に達するまで、30 °Cで増殖させた。それから酵母細胞を800 x gでの遠心分離により回収し、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で2回洗浄した。集められた酵母細胞を、2% ガラクトースを含有する合成ガラクトース培地(SG)において6-12時間培養して、タンパク質発現を誘導させた。

【0051】

以下のプラスミドがSUB2欠損株の構築のために作成された。この研究において使用されたオリゴヌクレオチドおよびプライマー全部の配列が表1~3にまとめられている。SUB2欠損株は、SUB2オープンリーディングフレーム全体をTRP1 (SUB2D::TRP1フラグメント)で置換することにより取得した(Lorenzら)。SUB2遺伝子のプロモーターおよびターミネーターのフラグメントは、プライマーとして、上流側フラグメントにSUB2 up-FORおよびSUB2 up-REV、下流側フラグメントにSUB2 down-FOR、SUB2 down-REVを用いて、PCRにより増幅した。鋳型として酵母細胞ゲノムDNAを使用した。上流側フラグメントを、Kpn IおよびSma Iを用いて消化し、Kpn IおよびSma I消化pBluescript(pBS)プラスミドにクローニングした。生成したプラスミドを、pBS-SUB2-upstreamと名づけた。下流側フラグメントを、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(TOYOBO)でリン酸化し、一方、BamH Iで消化しKlenow fragment(TaKaRa)で平滑化したpBS-SUB2-upstreamプラスミドにクローニングした。形成されたプラスミドはpBS-SUB2と名づけられ、プロモーターおよびターミネーターのフラグメント間にユニークなSma I部位を有していた。

【0052】

TRP1遺伝子フラグメントは、pRS314プラスミドからEco0109 IおよびSsp Iを用いる消化により切り出された。SUB2欠損用プラスミド(pBS-SUB2-TRP1)を構築するために、切り出されたTRP1遺伝子フラグメントは、Klenow fragmentにより平滑化し、Sma I消化pBS-SUB2プラスミドにクローニングした。

【0053】

SUB2D::TRP1フラグメントは、Bgl IIおよびBan IIIを用いる消化によりpBS-SUB2-TRP1

10

20

30

40

50

から切り出され、酵母株YPH499を形質転換するために使用された。TRP1形質転換体は、TRP1表現型の安定性について試験された。SUB2欠損は、RT-PCRおよびゲノムPCRにより確認された。

【 0 0 5 4 】

・酵母細胞へのDNA、RNAおよびvRNPの導入

プラスミドDNAで酵母細胞を形質転換するために、酢酸リチウム-ポリエチレングリコール法が使用された (Itoら)。RNAおよびvRNPの導入は、RNAの形質転換について記載された操作 (Russellら) に基づき、若干変更して実施した。

【 0 0 5 5 】

酵母細胞を50 mlの完全培地 (YPDA: yeast extract-peptone-dextrose medium containing adenine) 中で、細胞密度が 3×10^7 cells/ml になるまで30 で培養した。その後、酵母細胞を遠心機で集め (800 x g、2分間)、上清を捨て20 mlの0.9% NaCl溶液で、次いで20 mlの1 M Sorbitol溶液で洗浄し、20 mlのSCEM溶液 (1 M Sorbitol、0.1 M Sodium citrate (pH 5.8)、10 mM EDTA、30 mM 2-Mercaptoethanol) に再懸濁した。酵母が含まれる懸濁液にZymolyase-100Tを125 Uとなるように加え、30 で時折攪拌しながら保温した。スフェロプラストを低速遠心で集め、20 mlの1 M Sorbitol溶液により洗浄し、20 mlのSTC溶液 (1 M Sorbitol、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM CaCl_2) に再懸濁した。スフェロプラストは、遠心分離により集めて、2 mlのSTC溶液に再懸濁した。スフェロプラストにRNAまたはvRNPを導入するために、スフェロプラスト (100 ml) とvRNPまたはNS-yEGFP RNAとを混合し、室温で10分間インキュベートし、その後1 mlのPEG溶液 (20% polyethylene glycol 6000、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM CaCl_2) を加えた。静かに混ぜて、さらに室温で10分間静置し、スフェロプラストを遠心分離で集め、上清を捨て1 mlのSOS溶液 (1 M Sorbitol、6.5 mM CaCl_2 、50% YPDAまたは50% SD) に再懸濁した。

【 0 0 5 6 】

・酵母細胞からの全RNAの抽出ならびにRT-PCRおよびゲノムPCR

酵母細胞からの全RNAの抽出は、以前 (Leedsら) に記載されたようにして行なった。セグメント5 vRNA検出用のcDNAは、リバーstransクリプターゼ (TOYOBO) により、プライマーとしてNP-FORを用いて合成された。この1本鎖cDNAは、2個の特異的プライマー、NP 444-FORおよびNP 614-REVを用いて、PCR増幅された。

【 0 0 5 7 】

セグメント5 cRNA検出用のcDNAは、リバーstransクリプターゼにより、プライマーとしてNP 3'-ENDを用いて合成された。この1本鎖cDNAは、2個の特異的プライマー、NP 846-FORおよびNP 1121-REVを用いて、PCR増幅された。

【 0 0 5 8 】

セグメント5 mRNA検出用のcDNAは、リバーstransクリプターゼにより、プライマーとしてoligo-dTを用いて合成された。この1本鎖cDNAは、2個の特異的プライマー、NP 846-FORおよびNP 1121-REVを用いて、PCR増幅された。

【 0 0 5 9 】

セグメント3 vRNA検出用cDNAは、リバーstransクリプターゼにより、プライマーとしてPA-FORを用いて合成された。この1本鎖cDNAは、2個の特異的プライマー、PA 664-FORおよびPA 800-REVを用いて、PCR増幅された。

【 0 0 6 0 】

セグメント3 cRNA検出用cDNAは、リバーstransクリプターゼにより、プライマーとしてPA 3'-ENDを用いて合成された。この1本鎖cDNAは、2個の特異的プライマー、PA 1356-FORおよびPA 1683-REVを用いて、PCR増幅された。

【 0 0 6 1 】

セグメント3 mRNA検出用cDNAは、リバーstransクリプターゼにより、プライマーとしてoligo-dTを用いて合成された。この1本鎖cDNAは、2個の特異的プライマー、PA 1356-FORおよびPA 1683-REVを用いて、PCR増幅された。

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

セグメント7 cRNA検出用cDNAは、リバーストランスクリプターゼにより、プライマーとしてM1 3'-ENDを用いて合成された。この1本鎖cDNAは、2個の特異的プライマー、M1 897-FORおよびM1 1007-REVを用いて、PCR増幅された。

【 0 0 6 3 】

細胞内 mRNA検出用に、まずcDNAは、リバーストランスクリプターゼにより、プライマーとしてoligo-dTを用いて合成された。

酵母のACT1 mRNAについて、センスプライマーにACT1-FOR、アンチセンスプライマーにACT1-REVが、PCR増幅のために使用された。

【 0 0 6 4 】

ADH1 mRNAについて、センスプライマーにADH1-FOR、アンチセンスプライマーにADH 1-REVが、PCR増幅のために使用された。

SUB2 mRNAについて、センスプライマーにSUB2 1062-FOR、アンチセンスプライマーにSUB2-REVが、PCRのために使用された。

【 0 0 6 5 】

RDN25-1 rRNAについて、センスプライマーにRDN25-1-FOR、アンチセンスプライマーにRDN25-1-REVが、PCRのために使用された。

酵母ゲノムにあるTRP1遺伝子の検出のために、TRP1フラグメントが、プライマーとしてTRP1-FORおよびTRP1-REVを使用し、鋳型として酵母ゲノムDNAを用いてPCRにより増幅した。増幅した2本鎖DNAは7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて臭化エチジウムにより可視化した。

【 0 0 6 6 】

・酵母細胞内インフルエンザウイルスタンパク質発現用ベクターの構築

次のプラスミドが、酵母細胞内でインフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼサブユニットおよびNPを発現させるために構築された。

【 0 0 6 7 】

CYC1 TT (転写ターミネーター) 配列を有するDNAフラグメントが、プライマーとしてCYC1 TT-FORおよびCYC1 TT-REV、鋳型としてpYES2を用いるPCRにより増幅された。PCR産物は、Hind IIIおよびSpe Iによって消化し、Hind IIIおよびXba I消化pYES2プラスミドにクローニングした。形成されたプラスミド、pYES2-CYC1 TTは、GAL-1プロモーターとCYC1-TTとの間に、ユニークなHind III、Bgl II、Sma Iおよび Bst E II部位を含んでいる。

【 0 0 6 8 】

pYES2-PB1-CYC1 TTを構築するために、PB1コード配列に相当するDNAフラグメントが、プライマーとしてPB1-FORおよびPB1-REV2、鋳型としてpcDNA-PB1 (Neumannら) を用いるPCRにより増幅された。PCR産物は、T4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、Hind IIIを用いて消化してからSma IおよびHind III消化pYES2-CYC1 TTにクローニングした。

【 0 0 6 9 】

pYES2-PB2-CYC1 TTを構築するために、PB2コード配列に相当するDNAフラグメントが、プライマーとしてPB2-FOR1およびPB2-REV2、鋳型としてpcDNA-PB2 (Neumannら) を用いるPCRにより増幅された。PCR産物は、T4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、BamH Iを用いて消化してからSma IおよびBgl I消化pYES2-CYC1 TTにクローニングした。

【 0 0 7 0 】

pYES2-PA-CYC1 TTを構築するために、PAコード配列に相当するDNAフラグメントが、プライマーとしてPA-FORおよびPA-REV、鋳型としてpcDNA-PA (Neumannら) を用いるPCRにより増幅された。PCR産物は、T4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、BamH Iを用いて消化してからSma IおよびBgl I消化pYES2-CYC1 TTにクローニングした。

【 0 0 7 1 】

PB1、PB2、およびPA発現用プラスミド(それぞれpRS514-PB1、pRS317-PB2およびpRS315-PAと呼称)を構築するために、GAL-1プロモーター-PB1-CYC1 TT、GAL-1プロモーター-PB2-CYC1 TT、およびGAL-1プロモーター-PA-CYC1 TTを含有するDNAフラグメントを、Spe IおよびXba Iを用いてpYES2-PB1-CYC1 TT、pYES2-PB2-CYC1 TTおよびpYES2-PA-CYC1 TTか

10

20

30

40

50

ら切り出して、pRS514、pRS317およびpRS315のXba I部位にクローニングした。

【0072】

NP発現用プラスミド(pYES2-NPと呼称)を構築するために、NPコード配列に相当するDNAフラグメントが、プライマーとしてNP-FORおよびNP-REV、鋳型としてpCAGGS-NP(Turanら)を用いるPCRにより増幅された。PCR産物は、BamH IおよびEcoR Iを用いて消化してからBamH I およびEcoR I 消化pYES2プラスミドにクローニングした。

【0073】

・抗体

PB1、PB2およびPAに対するウサギポリクローナル抗体を、2ヶ月齢の雌ウサギ(Japan White; 東京実験動物)に、フロインド完全アジュバント(Sigma)中にある、それぞれ250 mgのヘキサヒスチジン・タグ(His-)PB1フラグメント、His-PB2フラグメントおよびHis-PAフラグメントを免疫することにより産生した。

【0074】

アミノ末端にはヘキサヒスチジン・タグを持つHis-PB1(PB1タンパク質のアミノ酸1-377を含む変異体)フラグメントが、免疫のために抗原として使用された。このPB1領域に対応するDNAフラグメントは、pcDNA-PB1から、特異的プライマーとしてPB1-FOR 2およびPB1-REV 2を用いてPCRにより増幅された。PCR産物はT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化してNde Iで消化された。フラグメントは、pET-14bのNde I部位とBamH I(BamH I消化後、Klenow fragment処理)部位との間でクローニングされた。

【0075】

アミノ末端にはヘキサヒスチジン・タグを持つHis-PB2フラグメント(PB2タンパク質のアミノ酸17-258を含む変異体)が、免疫のために抗原として使用された。このPB2領域に対応するDNAフラグメントは、pcDNA-PB2から、特異的プライマーとしてPB2-FOR 2およびPB2-REV 2を用いてPCRにより増幅された。PCR産物はXho Iで消化され、Xho I消化pET-14bプラスミドにクローニングされた。

【0076】

抗PA抗体および抗NP抗体の調製は、既に報告されたようにして行なった(Kawaguchiら; Takizawারা)。これらのプラスミドは、大腸菌BL21(DE3)の形質転換に使用された。不溶性フラクションとして回収された組換えタンパク質は、グアニジン緩衝液(20 mM Tris-HCl (pH7.4)、6 M Guanidine hydrochloride、500 mM NaCl)を用いて可溶化された。可溶化された組換えタンパク質は、pET System Manual(Novagen)の推奨プロトコルに従って、6 M 塩酸グアニジン存在下で、ヒスチジンタグ結合樹脂を用いて精製した。上記の動物は、2週のインターバルで、フロインド不完全アジュバント中にある150 mgの各タンパク質を用いて3回、免疫した。いずれの抗体も、ウェスタンブロッティングにおいて、希釈後の各抗体の力価が他のものと正確に同一となるように適切に希釈して免疫学的手法に使用した。

【0077】

・組換えタンパク質の調製

完全長SUB2遺伝子が、プライマーとしてSUB2-FOR(His-)およびSUB2-REV、鋳型として酵母ゲノムDNAを用いてPCRにより増幅した。PCR産物は、T4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、EcoR V消化pBSにクローニングした。生成プラスミドを、pBS-His-SUB2として名づけた。

【0078】

pET-21a-His-SUB2を構築するために、SUB2コード領域に対応するDNAフラグメントを、Nde IおよびBamH Iを用いる消化によって、pBS-His-SUB2プラスミドから切り出された。次いでこのDNAフラグメントを、Nde IおよびBamH I消化pET-21aにクローニングした。このプラスミドが、大腸菌BL21(DE3)の形質転換に使用された。His-SUB2タンパク質がヒスチジンタグ結合樹脂を用いて精製された。His-RAF-2p48/UAP56の調製が、既報(Momoseら)の通りに行なわれた。

【0079】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 本研究で使用したプライマーおよびオリゴヌクレオチド
(酵母ゲノム DNA と酵母遺伝子)

Table S1. Primers and oligonucleotides used in this study.

For yeast genomic DNA and yeast genes

Primer name	Sequence (5' to 3')	Source	Nucleotide positions
SUB2 up-FOR	GTTAGGTACCGAAIACTTGGCCAAGATCTTGG	<i>SUB2</i> promoter (Chromosome IV)	304495-304516 ^a
SUB2 up-REV	ACTTCCCCTGGGTCCAACAGGCCAAACAGTTCCG	<i>SUB2</i> promoter (Chromosome IV)	305122-305141 ^a
SUB2 down-FOR	CCGTGAATTCAACGTAGTGTAGTCAITTCGTG	<i>SUB2</i> terminator (Chromosome IV)	306713-306734 ^a
SUB2 down-REV	CGTGAATTCTTCTCCAACATCGAATCAGAG	<i>SUB2</i> terminator (Chromosome IV)	307159-307180 ^a
ACT1-FOR	ATGGATTCTGAGGTTGCTGCTTTGGTTATT	<i>ACT1</i> cDNA	1-30 ^b
ACT1-REV	GCGTGAGGTAGAGAGAAACC	<i>ACT1</i> cDNA	502-521 ^b
ADH1-FOR	ATGTCATCCCAGAAACTCAAAAAGG	<i>ADH1</i> cDNA	1-26 ^b
ADH1-REV	AACGTTTTCACCCATGCCGACA	<i>ADH1</i> cDNA	219-240 ^b

10

20

【 0 0 8 0 】

【表 2】

(表 1 の続き)

RDN25-1-FOR	CTGGTACCTTCGGTGCCC	<i>RDN25-1</i> cDNA	125-142 ^b
RDN25-1-REV	CGCTATCGGTCTCTCGCCA	<i>RDN25-1</i> cDNA	329-347 ^b
SUB2-FOR (His ⁺)	TTTCATATGCATCATCATCATCATCATGGTTCACACGAAGGTGAAGAAGA TTTAAIT	<i>SUB2</i> cDNA	4-29 ^b
SUB2 1062-FOR	GCTCGTTACAAGGCTTTCAAAGAT	<i>SUB2</i> cDNA	1039-1062 ^b
SUB2-REV	CCGGATCCCTTAATTATTCAAATAAGTGGACGGATCAAFGCCTTC	<i>SUB2</i> cDNA	1310-1341 ^b
TRP1-FOR	GGACGGCTAGCAACGACATTACTATATATAATATAGGAAGC	<i>TRP1</i> cDNA	1-32 ^b
TRP1-REV	GGCCGGCTCTCCCTTGGGCCCGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATA	<i>TRP1</i> cDNA	977-1002 ^b
CYC1 TE-FOR	CCCCAAGCTTAGATCTGCGCCCGGGTCAACATCATGTAATAGTTATGTC ACGCTTACATT	<i>CYC1</i> terminator	1-28 ^b
CYC1 TE-REV	CGGACTAGTGATATCCCGGGTCTAGAGCAAATTAAGCCTTCGAGCG	<i>CYC1</i> terminator	692-720 ^b

a スクレオチド位置 (Nucleotide positions) は、データベース (*Saccharomyces* ゲノムデータベース) の酵母染色体 IV のスクレオチド位置に対応する。*SUB2* は、クロモソーム IV のスクレオチド位置、305237~306577 間に位置している。

b スクレオチド位置 1 は、各 mRNA の 5' 末端を示している。

表中、“Primer name” は、プライマー名、“Sequence” は、配列、“Source” は、プライマーおよびオリゴヌクレオチドと相補鎖を形成する遺伝子を意味する。

【 0 0 8 1 】

【表 3】

表 2 本研究で使用したプライマーおよびオリゴヌクレオチド (インフルエンザウイルス遺伝子)

For influenza viral genes			
Primer name	Sequence (5' to 3')	Source	Nucleotide positions
PA-FOR	GATCCCGGGCATATGGAAGATTTTGTGCGACAATG	Segment 3 vRNA	25-47 ^c
PA 664-FOR	ATCACAGGAACAATGCGCAAGC	Segment 3 vRNA	643-664 ^c
PA 800-REV	GGTTCAAATTCIAGCAITTIACITCTTT	Segment 3 vRNA	775-800 ^c
PA 3'-END	AGTAGAAACAAGGIACITTTTTTGGAC	Segment 3 cRNA	2208-2233 ^d
PA 1356-FOR	CACATTGCAAGCATGAGAAGGAAT	Segment 3 c/mRNA	1333-1356 ^d
PA 1683-REV	GGCACTTCTIAGAAGCATATCTC	Segment 3 c/mRNA	1661-1683 ^d
NP-FOR	GGAATTCATATGGCGTCTCAAGGCACCAAACG	Segment 5 vRNA	46-68 ^e
NP 444-FOR	GACGATGCAACGGCTGGTCTG	Segment 5 vRNA	424-444 ^e
NP 614-REV	AGCAITGTTCCAACCTCCTTT	Segment 5 vRNA	595-614 ^e
NP 3'-END	AGTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTTA	Segment 5 cRNA	1540-1565 ^f
NP 846-FOR	CGGTCTGCACTCATATTGAGAGG	Segment 5 c/mRNA	826-846 ^f
NP 1121-REV	GAAAGCTTCCCTCTTGGG	Segment 5 c/mRNA	1104-1121 ^f
M1 3'-END	AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTACTC	Segment 7 cRNA	26-43 ^g

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

【 表 4 】

(表 2 の続き)

M1 897-FOR	TAAATACGGACTGAAAGGAG	Segment 7 c/mRNA	878-897 ^e	
M1 1007-REV	TTACTCCAGCTCTATGCTGACAAAAT	Segment 7 c/mRNA	982-1007 ^e	
PB1-FOR 1	CCCCAAGCTTGATATCGCGGCGCCACCATGGATGTCAAATCOGACCTT	PB1 cDNA	1-30 ^b	
PB1-REV 1	C GCGTCGACGGTACCTATTTTGGCGTCTGAGCTCTT	PB1 cDNA	2252-3274 ^b	
PB2-FOR 1	C GCGGATCCCGGGCGGCCCAACCAITGGAAAAGAATAAAAAGAACTAAG AAATCT	PB2 cDNA	1-29 ^b	10
PB2-REV 1	C GCGCTCGAGCTAATTGATGGCCATCOGAATTC	PB2 cDNA	2258-2280 ^b	
PA-FOR	C GCGGATCCCGGGCGGCCACCATGGAAGATTTTGTGCGACAATGCTTC	PA cDNA	1-27 ^b	
PA-REV	G GGGGGCCCTAACTCAATGCATGTGTAAGGAAGG	PA cDNA	2126-2151 ^b	
NP-FOR	T TGGATCCAAAATGGCTACTAAAGGTACTAAAAGATCT	NP cDNA	1-27 ^b	
NP-REV	G GAATTCATCTTAATTGTGCTACTCCTCTGCAITGT	NP cDNA	1472-1497 ^b	
PB1-FOR 2	G ATCCCGGGCATAEGGATGTC AATCCGACCTTAC	PB1 cDNA	1-22 ^b	
PB1-REV 2	G GCGCTCGAGCTACTAATCGATGCTTGCTAGCATTTC	PB1 cDNA	1111-1132 ^b	
PB2-FOR 2	G GCGCTCGAGCGCGAGATACTC AAAAAACC	PB2 cDNA	49-69 ^b	20
PB2-REV 2	G GCGCTCGAGCTACTAGCTTTGATCAACAATCATCAIT	PB2 cDNA	754-774 ^b	

^{c,d,e,f & g} インフルエンザウイルス RNA のヌクレオチド位置(Nucleotide positions)。ヌクレオチド位置 1 は、セグメント 3 vRNA^c、セグメント 3 cRNA、mRNA^d、セグメント 5 vRNA^e、セグメント 5 cRNA、mRNA^f、または セグメント 7 cRNA^g の 5'ウイルス由来末端を示している。

^h ヌクレオチド位置 1 は、各 mRNA の 5'末端を示している。

表中、“Primer name” は、プライマー名、“Sequence” は、配列、“Source” は、プライマーおよびオリゴヌクレオチドと相補鎖を形成する遺伝子を意味する。

【 0 0 8 3 】

10

20

30

【表 5】

表 3. 本研究で使用したプライマーおよびオリゴヌクレオチド
(モデルウイルス遺伝子および他のオリゴヌクレオチド)

For model viral genes and other oligonucleotides			
Primer name	Sequence (5' to 3')	Source	Nucleotide positions
Seg 5 digestion	GGAATTCATATGGTGAATGGAATGGTCAGAATGATCAAAC	Segment 5 vRNA	616-640 ⁱ
NS yEGFP-FOR	GTAGCAAAAGCAGGGTGACAAA ^j GACATAAATGCTAAAGGTGAGAGATTA	yEGFP cDNA	1-28 ^k
	TTCACCTG		
NS yEGFP-REV	AGTAGAAAACAAGGGTGTTTTTT ^l TTAATTGTACAATTCATCCATACCATGG	yEGFP cDNA	692-720 ^k
T7 vNS-FOR	TAATACGACTCACTATA ^m AGTAGAAAACAAGGGTGTTTT	Segment 8 vRNA	1-20 ⁿ
vNS-REV	AGTAGAAAACAAGGGTGTTTTTT	Segment 8 vRNA	868-890 ⁿ
T7 cNS-FOR	TAATACGACTCACTATA ⁿ AGCAAAAAGCAGGGTGACAAA	Segment 8 cRNA	1-20 ^o
cNS-REV	AGCAAAAAGCAGGGTGACAAA	Segment 8 cRNA	868-890 ^o
53-merVwt	AGUAGAAAACAAGGGGUGUUUUUUCUAUAUCAUUUAAACUUCACCCUGCU	Segment 8 vRNA	1-22, 874-890 ^p
	UUUGCU		

^{i,m,n} & ^o インフルエンザウイルス RNA のヌクレオチド位置(Nucleotide positions)。ヌクレオチド位置 1 は、セグメント 5 vRNAⁱ の 5'ウイルス由来末端、セグメント 8 vRNA^{m&o} の 5'末端、セグメント 8 cRNAⁿ の 5'末端を示している。

^{j&l} 下線部はセグメント 8 cRNAⁿ の 3'および 5'末端配列および T7 プロモーター配列^lを示す。

^k ヌクレオチド位置 1 は、mRNA の 5'末端を示している。

表中、“Primer name” は、プライマー名、“Sequence” は、配列、“Source” は、プライマーおよびオリゴヌクレオチドと相補鎖を形成する遺伝子を意味する。

【 0 0 8 4 】

< 方法2の項で引用された文献 >

- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168 (1983).
- Kawaguchi, A., Naito, T. & Nagata, K. Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J Virol* 79, 732-744 (2005).
- Leeds, P., Peltz, S. W., Jacobson, A. & Culbertson, M. R. The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 5, 2303-2314 (1991).
- Lorenz, M. C. et al. Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 158, 113-117 (1995).
- Momose, F. et al. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* 75, 1899-1908 (2001).
- Neumann, G. et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9345-9350 (1999).
- Russell, P. J., Hambidge, S. J. & Kirkegaard, K. Direct introduction and transient expression of capped and non-capped RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 19, 4949-4953 (1991).
- Takizawa, N. et al. *Microbes and Infection* in press.
- Turan, K. et al. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res* 32, 643-652 (2004).

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定するものではない。

10

20

40

50

【実施例 1】

【0085】

酵母細胞内へのvRNP導入

用いた酵母は、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のYPH499株を使用した。酵母を50 mlの完全培地中(YPDA: yeast extract-peptone-dextrose medium containing adenine)で細胞密度が 3×10^7 cells/mlになるまで30 で培養した。その後、酵母細胞を遠心機で集め(800 x g、2分間)、上清を捨て20 mlの0.9% NaCl溶液に懸濁した。酵母細胞を遠心機で集め(800 x g、2分間)、上清を捨て20 mlの1 M Sorbitol溶液に懸濁した。酵母細胞を遠心機で集め(800 x g、2分間)、上清を捨て20 mlのSCEM溶液(1 M Sorbitol、0.1 M Sodium citrate (pH 5.8)、10 mM EDTA、30 mM 2-Mercaptoethanol)に懸濁した。酵母が含まれる懸濁液にZymolyase-100Tを125 Uとなるように加え、30 で45分から60分間保温した。酵母細胞の細胞壁が破壊されていることを顕微鏡で確認した後、遠心機で集め(400 x g、1分間)、上清を捨て20 mlの1 M Sorbitol溶液に懸濁した。酵母細胞を遠心機で集め(400 x g、1分間)、上清を捨て20 mlのSTC溶液(1 M Sorbitol、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM CaCl_2)に懸濁した。酵母細胞を遠心機で集め(400 x g、1分間)、上清を捨て2 mlのSTC溶液に懸濁した。この酵母懸濁液100 mlにvRNPを3-20 mlを加えて静かに混ぜ、室温で10分間静置した。その後、1 mlのPEG溶液(20% polyethylene glycol 6000、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM CaCl_2)を加えて静かに混ぜ、室温で10分間静置した。酵母細胞を遠心機で集め(400 x g、1分間)、上清を捨て1から2 mlのSOS溶液(1 M Sorbitol、6.5 mM CaCl_2 、50% YPDA)に懸濁し30 で培養した。

10

20

【実施例 2】

【0086】

酵母細胞においてインフルエンザウイルスゲノムの複製および転写

まず、ピリオンから精製されたvRNPが酵母細胞において感染性であるかどうか調べるために、上記のようにしてvRNPを酵母細胞に導入した。ウイルスRNA、すなわちvRNA、cRNA(相補的RNA、つまりvRNA増幅の鋳型)およびウイルスmRNAの合成量を、RT-PCR法により解析した(図1a)。vRNPがトランスフェクトされた酵母細胞において合成されるウイルスRNA量は、トランスフェクトされたvRNPの量に応じて増加した。このことは他のウイルスRNAセグメントについても同様である(データは示さず)。これらの結果は、ウイルスRNAポリメラーゼおよびNPが酵母細胞において活性であることを示している。ウイルス感染した哺乳類細胞において、最初の転写は、感染するvRNPに依存するが、ウイルスゲノムの複製には、新しく合成されるウイルスタンパク質が必要とされる⁴。vRNPがトランスフェクトされた酵母細胞が、シクロヘキシミド(CHX)で処理されると、ウイルスRNAの合成レベルは激減した(図1b)。よって、酵母内のウイルスRNA合成が、新しく合成されるウイルスタンパク質に依存していることがわかる。ウイルスmRNAの合成もまたCHX処理に感受性があることから、ウイルスmRNAのほとんどは、この系において、新規に合成されたvRNAを鋳型として合成していることを示唆している。さらに酵母細胞においてこのように合成されたウイルスmRNAが機能することもわかった。間接蛍光抗体法から(図1c-k)、NPがvRNPをトランスフェクトした酵母細胞では検出されたが、CHX処理した細胞では検出されなかった(図1f)。トランスフェクトする前に、vRNPをRNase Aで処理すると、NPの発現は消失した(図1i)。これは、ウイルス遺伝子の発現が、vRNP複合体に含まれるvRNAに依存していることを示す。以上より酵母細胞は、トランスフェクトされるvRNPに依存するウイルス遺伝子転写、およびウイルスゲノム複製を支えていると結論された。

30

40

【0087】

(図1の説明)

a 酵母スフェロプラストは、偽トランスフェクトされる(レーン1)か、あるいはピリオンから精製されたvRNPでトランスフェクトされた(レーン2、3、4および5についてそれぞれ0.1、0.3、1および2 mgのNPを含むvRNPをトランスフェクションした)。トランスフェクション後(hpt)48時間で、酵母全RNAが抽出され、逆転写反応にかけられた。ACT1 mRNAおよびセグメント5のマイナス-センスRNA(vRNA)に特異的なプライマーセット、ならびに

50

プラス-センスRNA(mRNA、cRNA)に特異的なプライマーセットを使用してPCRが行なわれた。増幅された2本鎖DNAは、7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分離され、臭化エチジウムにより可視化されている。

【0088】

b vRNPでトランスフェクトされた酵母細胞を、シクロヘキシミド(CHX)の非存在下(レーン1および2)ならびに存在下(レーン3; 3 mg/ml、レーン4; 10 mg/ml)でインキュベートされた。RT-PCRがセグメント3 RNAおよびACT1 mRNAに特異的なプライマーを用いて行なわれた。

【0089】

c-k vRNPトランスフェクトされた酵母細胞を24 hptで、免疫染色した。NPおよびDNAは、それぞれ抗NP抗体(c、f、i)およびDAPI(d、g、j)で染色した。

overlay NP染色およびDAPI染色のパネル(e、h、k)の重ねあわせである。酵母細胞は、5 mg/ml CHXの非存在下(c-e、l-k)ならびに存在下(f-h)でインキュベートされた。トランスフェクションに先立ち、vRNPは、37 °Cで10分間、RNase Aで処理された(i-k)。

【実施例3】

【0090】

セグメント5欠損vRNPの相補実験

NPをコードするセグメント5 vRNAを欠いているvRNP複合体について、NP発現酵母細胞を用いて相補する実験を行なった。NPは、vRNP複合体の形成およびウイルスRNA鎖の伸長反応に必要とされる。vRNP複合体からセグメント5 vRNAを、RNase Hを用いて、セグメント5 vRNAの一部に相補的なオリゴヌクレオチドの存在下で、除去した¹²(方法2の項を参照)。RNase H処理によって、セグメント5 vRNAの量は著しく減少し、消化後に、いくつかの切断されたバンドが出現した(図2a)。次に、セグメント5 vRNAを欠いているvRNP複合体(以後、欠損vRNPと記す)ならびに偽消化vRNP複合体が酵母細胞に導入された。pYES2またはpYES2-PB2を用いて形質転換された酵母細胞において、欠損vRNPはcRNA合成をもたらさなかった(図2b、レーン3および9)。対照的にpYES2-NPで形質転換された酵母細胞では、cRNA合成を検出できた(図2b、レーン6)。NPおよびPB2の発現が図2cで確認できる。これらの結果から、欠損vRNPを使用し、そのためにNPの発現を欠いている系をプラスミドより発現させたNPが相補することが示された。さらに酵母細胞におけるそうした複製過程はNPに依存することもわかった。

【0091】

(図2の説明)

a セグメント5 vRNAの消化

vRNP(3 mgのNPを含有する)を、0.4 M NaCl存在下で、セグメント5 vRNAの一部(方法1; Seg 5 digestion)に相当するオリゴヌクレオチド300 ngと37 °C、5分間、混合した。次に37 °C、5分間、30 UのRNase Hで処理(レーン1)または偽処理(レーン2)した。精製RNAを、7.7 M尿素を含む3.2%ポリアクリルアミドゲルにかけて銀染色により可視化した。

*印は、消化されたフラグメントにおそらく相当するバンドを指示している。

【0092】

b ウイルスRNAのRT-PCR解析

vRNPおよびセグメント5 vRNAを欠いているvRNP(RNase H消化)が、pYES2(レーン1-3)、pYES2-NP(レーン4-6)、ならびにpYES2-PB2(レーン7-9)で形質転換された酵母細胞にトランスフェクトされた。酵母細胞は、ガラクトース含有培地に24時間インキュベートされた。RT-PCR解析が、セグメント3 cRNAおよびADH1 mRNAに特異的なプライマーを用いて行なわれた。

【0093】

c 誘導されたウイルスタンパク質のウェスタンブロッティング解析

コントロール(レーン1および2)、NP(レーン3および4)、PB2(レーン5および6)

【実施例4】

【0094】

10

20

30

40

50

モデルウイルスRNAの複製および転写

次に、vRNP複合体を構成しているウイルス性因子全部を、プラスミドより発現させ置換することの試みがなされた。GAL-1プロモーターによる調節の下で、PB1、PB2、PAおよびNPを発現するプラスミドを構築した（方法2の項を参照）。ガラクトースによる誘導後、これらのプラスミドを一緒に用いて形質転換された酵母細胞において各ウイルスタンパク質が合成された（図3y）。T7 RNAポリメラーゼによる *in vitro* 転写系を用いて^{1,2}、マイナス鎖モデルウイルスRNAおよびプラス鎖モデルウイルスRNA、すなわちモデルvRNAおよびモデルcRNA（yEGFPコード領域は、NSをコードするセグメント8 vRNAの5'-末端配列および3'-末端配列で挟まれる）を調製したが、それぞれvNS-yEGFP、vNS-yEGFPと言う。ウイルスRNAポリメラーゼおよびNPを発現している酵母細胞が、*in vitro*で合成されたNS-yEGFP RNAでトランスフェクトされた。ガラクトース誘導により3つのウイルスRNAポリメラーゼサブユニットとNPが発現する酵母細胞において、yEGFP発現が、両方のセンスのNS-yEGFP RNAから検出された（図3hおよび3t）。酵母細胞の5-10%が、検出できるレベルのyEGFPの発現した（データは示さず）。全く対照的に、3つのポリメラーゼサブユニットのうちのいずれかを欠くか、あるいはNPを欠いている酵母細胞は、yEGFPの発現を示さなかった（図3i-lおよび3u-x）。

【0095】

以上の結果から、外部から導入したモデルウイルスゲノムの複製および転写は、3つのポリメラーゼサブユニットおよびNPを必要とすることがわかった。

【0096】

（図3の説明）

a-x yEGFP遺伝子を含むモデルウイルスRNAゲノムからのyEGFP発現

ウイルスRNAポリメラーゼサブユニット（PB1、PB2およびPA）およびNPを発現している酵母スフェロプラストは、vNS-yEGFP（マイナス-センス、a-l）あるいはcNS-yEGFP（プラス-センス、m-x）の *in vitro*で合成されたRNAでトランスフェクトされた。次いでSD（グルコース）またはSG（ガラクトース）培地で30、24時間インキュベートした。DAPI染色DNA（a-fおよびm-r）ならびにyEGFP（g-lおよびs-x）が蛍光顕微鏡下で可視化された。

y 誘導発現されたウイルスタンパク質のウェスタンブロットング解析

酵母細胞は図の上部に示すようなプラスミドで形質転換された。SD（レーン1）またはSG（レーン2-6）のいずれかで対数増殖している形質転換体から調製された溶解液をウェスタンブロットング解析にかけた。

【実施例5】

【0097】

SUB2欠損の効果

以前に宿主因子と同定¹³された、RAF-2p48のウイルスRNA合成に与える機能を上記の系を使用し検討した。RAF-2p48は、NP-RNA複合体形成を促進し、モデルウイルスRNAからの *in vitro* RNA合成を促進する。RAF-2p48は、RNAスプライシング因子であるUAP56と同一である。SUB2は、RAF-2p48/UAP56の推定上 *S. cerevisiae* オルソログ(orthologue)であるが、これはSm snRNPと結合し、細胞機能の維持に働いている¹⁴。

【0098】

SUB2は、ヒトRAF-2p48/UAP56と62%のアミノ酸配列相同性を共有している¹⁵。酵母細胞でのSUB2の遺伝的解析に先行して、SUB2が *in vitro*でインフルエンザウイルスRNA合成を促進するかどうかを調べた。組換え体RAF-2p48/UAP56およびSUB2タンパク質は、ともに *in vitro* RNA合成を促進した（図4a）。SUB2のウイルスRNA合成促進活性は、RAF-2p48/UAP56の50%ほどであった。この結果から、SUB2が酵母細胞内のウイルスゲノム複製に対し、宿主因子として機能するかも知れない。そこで、酵母細胞におけるウイルスRNA合成に対するSUB2欠損の効果について調べられた。

【0099】

SUB2欠損株がそのORFをTRP1マーカー（TRP1 marker）で置き換えることにより構築され（図4b、右パネル）（方法2の項参照）、SUB2 mRNAが発現されないことが判明した（図4b、

10

20

30

40

50

左パネル)。vRNPをトランスフェクトしたSUB2欠損株において、cRNA合成は、野生型株のそれと比べると著しく低下した(図4c、レーン4および8と比較せよ(PCRサイクル;26))。このことは、その欠損効果はcRNA合成の方が大きいけれども、mRNA合成の場合にも同様に当てはまる。以上のことからSUB2は、酵母細胞の宿主因子として、ウイルスRNA合成を促進することが示唆される。vRNPをトランスフェクションした酵母を、より長くインキュベーションすると、SUB2欠損株におけるウイルスRNA合成活性は野生型株より低下しているがRNA合成量が蓄積し、回復してくる。(図4c、レーン3および8と比較せよ)。そこで酵母はSUB2機能を相補する別の宿主因子を持つのではないかと推定される。このことから、SUB2欠損株は致死的ではないと考えられる(データを示さず)。

【0100】

以上まとめると、細胞内において、RAF-2p48/UAP56はウイルスRNA合成の宿主因子であると示唆される。本発明の酵母系は、さらに多くの宿主因子候補を同定することが可能である。候補物質が挙げれば、脊椎動物の培養細胞の系に戻り、その候補の実証と特徴が明らかにされる。

【0101】

(図4の説明)

a 組換え体RAF-2p48およびSUB2タンパク質のウイルスRNA合成促進作用

in vitro RNA合成が、組換え体RAF-2p48(レーン2-4)、SUB2(レーン5-7)、ウシ血清アルブミン(BSA、レーン8-10)の存在下(10 ng(レーン2、5、8)、30 ng(レーン3、6、9)、100 ng(レーン4、7、10))、または非存在下(レーン1)で行なわれた。53塩基モデルウイルスゲノムからのRNA産物は、矢じり形で示した。

【0102】

b RT-PCRおよびゲノムPCRを、酵母から調製した全RNAと酵母ゲノムDNA(野生型株およびSUB2欠損株からそれぞれ調製)を用いて実施した。SUB2、ADH1 mRNA、TRP1遺伝子に特異的なプライマーセットを使用した。

【0103】

c ウイルスRNA合成に対するSUB2欠損の効果

野生型株およびSUB2欠損株をvRNPでトランスフェクトし、9時間(レーン2および6)、12時間(レーン3および7)および15時間(レーン4および8)インキュベートしてから全RNAを抽出した。RT-PCRを、セグメント7 cRNAとRDN25-1 rRNAに特異的なプライマーセットを使用して行なった。偽トランスフェクトした酵母細胞から抽出した全RNAもまた解析した(レーン1および5)。

【0104】

なお上記の実施例において、使用された菌株、材料、薬剤などはこの発明の範囲内の好適例にすぎない。また、用いられた装置、使用試薬類の濃度、使用量、処理時間、処理温度等の数値的条件、処理方法等は、この発明の範囲内の好適例にすぎない。

【産業上の利用可能性】

【0105】

インフルエンザウイルス複製過程に関与しているいくつかの宿主因子は、生化学的手法によって同定されてきた^{13,16-19}。さらに宿主因子を同定し、その役割を解明するためには、系統的なスクリーニングシステムの必要性が長く提起されてきた。本発明において、酵母細胞を用いて新規なインフルエンザウイルスゲノム複製および転写の系を開示した。酵母細胞は、あるプラス鎖RNAウイルス(例えば、brome mosaic virus、tomato bushy stunt virus)ゲノムの複製を支えることは示されてきている^{20,21}。これらの遺伝学的な系はウイルス因子のみならず宿主因子を同定し、その特徴を明らかにするために有用であることが立証されている。開発された本発明の系を用いて、宿主因子の系統的かつ遺伝的なスクリーニングが可能となった。酵母の遺伝学は、便利で強力であるために、我々の系に倣う戦略は、他のマイナス鎖RNAウイルスにも適用可能である。このため、本発明の酵母系は、ウイルス因子および/またはウイルス因子と宿主因子との相互作用をターゲットとする抗インフルエンザ薬剤のスクリーニングに適用されることは強調されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 6 】

< 引用文献 >

1. Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Pavin, J. D. & Palese, P. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* 59, 1107-1113 (1989).
2. Yamanaka, K., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Ishihama, A. & Nagata, K. In vivo analysis of the promoter structure of the influenza virus RNA genome using a transfection system with an engineered RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5369-5373 (1991).
3. Neumann, G. et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9345-9350 (1999). 10
4. Kawaguchi, A., Naito, T. & Nagata, K. Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J Virol* 79, 732-744 (2005).
5. Taubenberger, J. K. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437, 889-893 (2005).
6. Ahlquist, P., Noueiry, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B. & Dye, B. T. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 77, 8181-8186 (2003).
7. Prentice, E., McAuliffe, J., Lu, X., Subbarao, K. & Denison, M. R. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J Virol* 78, 9977-9986 (2004). 20
8. Scholle, F., Girard, Y. A., Zhao, Q., Higgs, S. & Mason, P. W. trans-Packaged West Nile virus-like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito vectors. *J Virol* 78, 11605-11614 (2004).
9. Lindenbach, B. D. et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623-626 (2005).
10. Rochovansky, O. M. & Hirst, G. K. Infectivity and marker rescue activity of influenza virus ribonucleoprotein-polymerase complexes. *Virology* 73, 339-349 (1976). 30
11. Portela, A. & Digard, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 83, 723-734 (2002).
12. Enami, M. & Enami, K. Characterization of influenza virus NS1 protein by using a novel helper-virus-free reverse genetic system. *J Virol* 74, 5556-5561 (2000).
13. Momose, F. et al. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* 75, 1899-1908 (2001).
14. Noble, S. M. & Guthrie, C. Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations. *Genetics* 143, 67-80 (1996). 40
15. Libri, D., Graziani, N., Saguez, C. & Boulay, J. Multiple roles for the yeast SUB2/yUAP56 gene in splicing. *Genes Dev* 15, 36-41 (2001).
16. Momose, F. et al. Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* 277, 45306-45314 (2002).
17. Wolff, T., O'Neill, R. E. & Palese, P. Interaction cloning of NS1-I, a human protein that binds to the nonstructural NS1 proteins of influenza A and B viruses. *J Virol* 70, 5363-5372 (1996).
18. Elton, D. et al. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the c 50

- ellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* 75, 408-419 (2001).
19. Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., Ortin, J. & Nieto, A. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* 75, 8597-8604 (2001).
20. Panavas, T., Serviène, E., Brasher, J. & Nagy, P. D. Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7326-7331 (2005).
21. Kushner, D. B. et al. Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15764-15769 (2003).
22. Spector, L. D. *Cells: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y, 106.3-106.7 (1998).
23. Yamanaka, K., Ishihama, A. & Nagata, K. Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* 265, 11151-11155 (1990).

10

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1】図1は、酵母細胞でのインフルエンザウイルスゲノムの複製と転写を示す。“Overlay”は、重ね合わせであり、“Seg. 5”および“Seg. 3”はそれぞれウイルスRNAのセグメント5およびセグメント3を意味する。

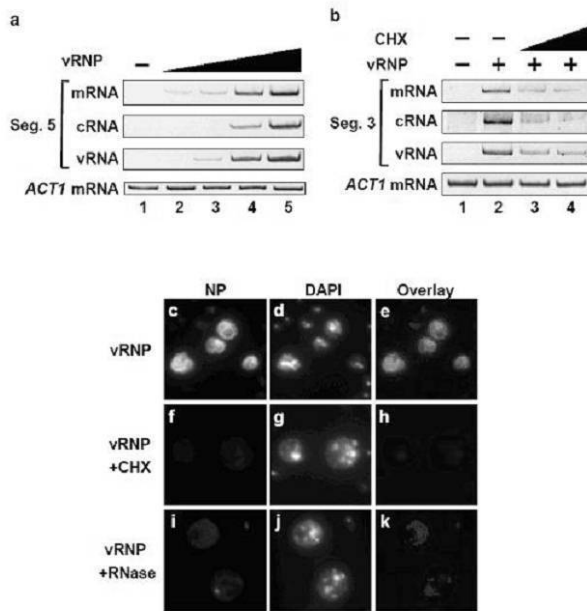
20

【図2】図2は、セグメント5欠損vRNPの相補を示す。“RNase H digestion”は、RNase Hによる消化を意味する。

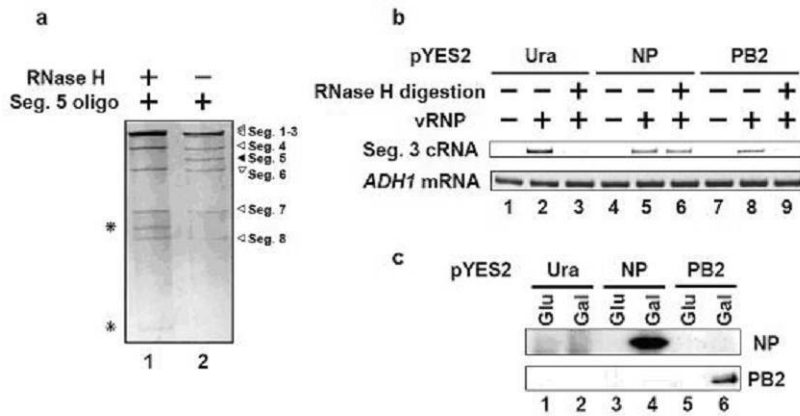
【図3】図3は、モデルウイルスRNAの複製および転写を示す。

【図4】図4は、SUB2欠損の効果を示す。“mock”は、偽を意味する。“Seg. 7”はセグメント7を意味する。

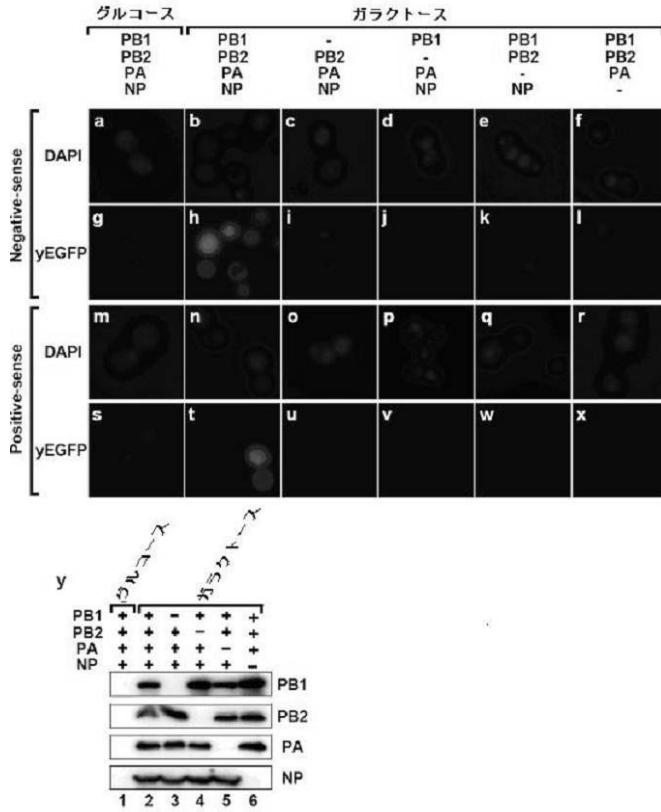
【 1 】



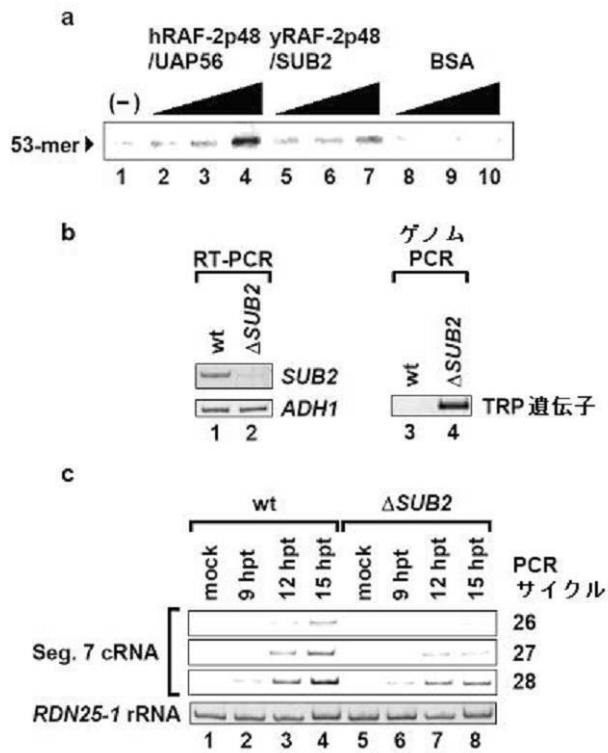
【 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 Virology, 1976, Vol.73, p.339-349

Cell, 1989, Vol.59, p.1107-1113

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, Vol.88, p.5369-5373

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, Vol.87, p.3802-3805

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, Vol.83, p.8117-8121

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 1/70

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

WPI