

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-270021

(P2005-270021A)

(43) 公開日 平成17年10月6日(2005.10.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/08	C O 7 K 14/08	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-89871 (P2004-89871)	(71) 出願人 304036743 国立大学法人宇都宮大学 栃木県宇都宮市峰町350番地
(22) 出願日 平成16年3月25日(2004.3.25)	
特許法第30条第1項適用申請有り 平成16年3月16日 日本植物病理学会発行の「平成16年度日本植物病理学会大会プログラム・講演要旨予稿集」に発表	(74) 代理人 100072051 弁理士 杉村 興作
	(74) 代理人 100100125 弁理士 高見 和明
	(74) 代理人 100101096 弁理士 徳永 博
	(74) 代理人 100086645 弁理士 岩佐 義幸
	(74) 代理人 100107227 弁理士 藤谷 史朗
	(74) 代理人 100114292 弁理士 来間 清志
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸、ポリペプチド、及び当該核酸を含む組み換えベクター

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ウイルスの弱毒化の機構を明らかにすると共に、より安全で有用な植物ワクチンを提供し得る、核酸、アミノ酸配列を提供する。

【解決手段】 核酸はキュウリモザイクウイルス(CMV)由来で、以下の(a)、又は(b)からなる。(a)特定の塩基配列からなる核酸。(b)前記特定の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記特定の塩基配列の中の特定番目の塩基がTであり、前記塩基配列と80%の相同性を有する核酸。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする核酸。

(a)配列表の配列番号1に示す、塩基配列番号1 3043で示される塩基配列からなる核酸。

(b)前記塩基配列番号1 - 3043の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列番号の2553番目の塩基がTであり、前記塩基配列と80%の同一性を有する核酸。

## 【請求項 2】

以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とするポリペプチド。

10

(a)配列表の配列番号2に示す、アミノ酸配列番号1 - 857で示されるアミノ酸配列。

(b)(a)のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列。

## 【請求項 3】

以下の(a)又は(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。

(a)配列表の配列番号3に示す、アミノ酸配列番号1-110で示されるアミノ酸配列。

(b)(a)のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列。

## 【請求項 4】

キュウリモザイクウイルス(以下、CMVともいう)由来の弱毒性を有する請求項2又は3項に記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

請求項1記載の核酸からなることを特徴とするプローブ。

20

## 【請求項 6】

配列表の配列番号1に記載の2553番目の塩基配列を、T及びCとの間で点変異させることを特徴とする突然変異株の生産方法。

## 【請求項 7】

TからCへ点変異させる請求項6記載の方法。

## 【請求項 8】

CからTへ点変異させる請求項6記載の方法。

## 【請求項 9】

請求項1記載の核酸を含む組換えベクター。

30

## 【請求項 10】

請求項1記載の核酸又は請求項9記載の組換えベクターを宿主細胞へ導入して得られる形質転換体。

## 【請求項 11】

配列表の配列番号1に記載の2553番目の塩基を少なくとも含む核酸選別用プライマー。

## 【請求項 12】

本発明の核酸は、以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号4に示す、塩基配列番号1 21で示される塩基配列からなる核酸。

(b)前記塩基配列番号1 - 21の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列と80%の同一性を有する核酸。

40

## 【請求項 13】

本発明の核酸は、以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号5に示す、塩基配列番号1 21で示される塩基配列からなる核酸。

(b)前記塩基配列番号1 - 21の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列と80%の同一性を有する核酸。

## 【請求項 14】

請求項11～13記載の核酸を用いて、キュウリモザイクウイルス(CMV)の毒性を調べることを特徴とするCMVの毒性検査方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、核酸、ポリペプチドに関し、特に植物ウイルスに係る核酸、ポリペプチドに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

植物ウイルスは世界中で900種以上といわれ、同じ種類のウイルスでも、植物に感染して、強い症状を引き起こすものもあれば、弱いものもある。当該（弱い）弱毒ウイルスを予め植物に予防接種しておく、（強い）強毒ウイルスが感染しても植物が保護されるという、あたかも、ワクチン様の作用を有すること、言うなれば植物ワクチンとして作用することが明らかにされている。

10

## 【0003】

例えば、このようないわゆる植物ワクチンとして、サテライトRNAを利用した（もの）キュウリモザイクウイルス（以下、CMVともいう）が知られている（佐山春樹（2003）植物ワクチン 化学と生物 41（7）454～459頁）。これは、現在までに実用化されたCMVの弱毒ウイルス（ワクチン）を総説しつつ、サテライトRNAに着目し、ワクチン効果を達成せんとするものである。サテライトRNAは、CMVに付随する（或いは寄生する）短いRNAがCMV-RNAの増殖を抑制する性質を利用したものである。

【非特許文献1】（佐山春樹（2003）植物ワクチン 化学と生物 41（7）454～459頁）

20

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

しかしながら、上述のサテライトRNAを用いた技術においては、サテライトRNAの種類によって寄生できるCMV株や寄生しにくいCMV株、および増殖しやすい植物種や増殖しにくい植物種が存在するという、相性の問題がある。また、サテライトRNAには感染作物でCMVの病徴を激しくするものもある。このため、ある作物に適合したCMVのワクチン株を選抜するためには、その作物に適合した弱毒サテライトRNAと、そのサテライトRNAの増殖をサポートできるCMVの両方を見つけなければならない。その作物に適合したCMVはすぐにみつけるが、適合した弱毒性のサテライトRNAを見つけるのは難しいという問題点を有する。

30

## 【0005】

したがって、すべてのCMV株に簡単に弱毒性を付与することができる技術が望まれている。

## 【0006】

また、遺伝子配列のどの部分において、弱毒強毒性について関与しているのか未だ不明である。当該部分を明らかにすることができれば、今後の植物ワクチンの新たな展開を提供し得るが、このような解明はなされていない。

## 【0007】

そこで、本発明は、ウイルスの弱毒化の機構を明らかにすると共に、より安全で有用な植物ワクチンを提供し得る、核酸、アミノ酸配列を提供することにある。

40

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

上記目的を達成するために、発明者らは、近縁のウイルスや系統間において、最初に接種したウイルスが、後から接種したウイルスの増殖を阻害する現象に着目し鋭意研究を重ねた結果、本発明の核酸、アミノ酸配列、突然変異株の生産方法を見出すに至った。

## 【0009】

すなわち、本発明の核酸は、以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする。(a)配列表の配列番号1に示す、塩基配列番号1～3043で示される塩基配列からなる核酸。(b)前記塩基配列番号1～3043の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列番号の2553番目の塩基がTであり、前記塩基配列と80%の相同性を

50

有する核酸。

【0010】

また、本発明のポリペプチドは、以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号2に示す、アミノ酸配列番号1-857で示されるアミノ酸配列。

(b)(a)のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列。

【0011】

また、本発明のポリペプチドは、以下の(a)又は(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号3に示す、アミノ酸配列番号1-110で示されるアミノ酸配列。

(b)(a)のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列。

10

【0012】

また、本発明のポリペプチドの好ましい実施態様において、キュウリモザイクウイルス(以下、CMVともいう)由来の弱毒性を有することを特徴とする。

【0013】

また、本発明のプロープは、請求項1記載の核酸からなることを特徴とする。

【0014】

また、本発明の突然変異株の生産方法は、配列表の配列番号1に記載の2553番目の塩基配列を、T及びCとの間で点変異させることを特徴とする。

【0015】

また、本発明の突然変異株の生産方法の好ましい実施態様において、TからCへ点変異させることを特徴とする。

20

【0016】

また、本発明の突然変異株の生産方法の好ましい実施態様においてCからTへ点変異させることを特徴とする。

【0017】

また、本発明の組換えベクターは、請求項1記載の核酸を含むことを特徴とする。

【0018】

また、本発明の形質転換体は、請求項1記載の核酸又は請求項9記載の組換えベクターを宿主細胞へ導入して得られることを特徴とする。

【0019】

また、本発明の核酸選別用プライマーは、配列表の配列番号1に記載の2553番目の塩基を少なくとも含むことを特徴とする。

30

また、本発明の核酸は、以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号4に示す、塩基配列番号1-21で示される塩基配列からなる核酸。

(b)前記塩基配列番号1-21の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列と80%の同一性を有する核酸。

【0020】

また、本発明の核酸は、以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号5に示す、塩基配列番号1-21で示される塩基配列からなる核酸。

40

(b)前記塩基配列番号1-21の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列と80%の同一性を有する核酸。

【0021】

また、本発明のCMVの毒性検査方法は、本発明の請求項11又は12記載の核酸を用いて、キュウリモザイクウイルス(CMV)の毒性を調べることを特徴とする。

【発明の効果】

【0022】

本発明によれば、CMVの弱毒化機構を提供することができるので、弱毒化に関する新たな研究材料を提供し得るという有利な効果を奏する。

50

## 【0023】

また、本発明の核酸、ポリペプチド、及び突然変異体などを利用することにより、植物を保護する、いわゆる植物ワクチンとして有効に利用可能であるという有利な効果を奏する。しかも本来天然に存在する弱毒ウイルスを利用するものであり、その安全性も高いという有利な効果を奏する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0024】

本発明の核酸は、以下の(a)、又は(b)、すなわち、(a)配列表の配列番号1に示す、塩基配列番号1 3043で示される塩基配列からなる核酸、

(b)前記塩基配列番号1 - 3043の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列番号の2553番目の塩基がTであり、前記塩基配列と80%の相同性を有する核酸、からなる。なお、核酸が、RNAの場合も本発明に包含されるが、この場合には、2553番目の塩基はUである。

10

## 【0025】

当該核酸情報を用いて、たとえばRT-PCR法やRT-PCR-RFLP法を利用することにより、植物が弱毒性のキュウリモザイクウイルス(CMV)に感染しているか否かを検討することができる。すなわち、配列表の配列番号1に記載されている核酸は、弱毒性を示すCMV由来のものであり、当該核酸情報を用いることにより、感染しているCMVが強毒性か弱毒性かの識別、あるいはCMVの弱毒株の選抜に利用できる。あるいは当該核酸はCMVのRNA2なので、他のCMVのRNA1とRNA3と混合することにより、新たな弱毒株(ワクチン株)を作製できる。さらに、当該核酸を植物に導入して組換え植物を作製し、CMVに対する抵抗性を付与する、などの有用性を有する。この点についてさらに説明すれば、以下のとおりである。

20

## 【0026】

まず基本的にCMVのワクチンとして利用できる弱毒株の選抜に利用することができる。ここではさらにふたつ考えることができる。まず、本発明の核酸あるいはポリペプチドに関する情報をもとに、自然界に分布しているCMVあるいは突然変異が起きやすいような処理をしたCMV感染植物から、ワクチンとして利用できる弱毒株を選抜できる。本発明の2bの46番目のアミノ酸がシステインになると弱毒性になることは証明済みなので、PCR法、RFLP、プローブによるスクリーニング法等でこの変異を有する株を検出すれば、接種試験をしなくてもその分離株は弱毒であることがわかるので、優良ワクチンを選抜するのが迅速になる。RFLP法を利用する場合には、制限酵素として、例えば、GCGC配列を切断する制限酵素HhaIなどを挙げることができる。2553番目を含む近傍の塩基配列を含むcDNA断片を増幅してHhaIで処理すると、弱毒株由来のcDNAは切断されず、強毒株由来のcDNAは切断される。これを利用すれば、弱毒及び強毒の選別が可能となる。

30

## 【0027】

もうひとつは、CM95のようにすでにこの変異を有する株を他の強毒株と混合感染して、そこから単一局部病斑分離法でCMVを分離すると、弱毒変異を有するRNA2と強毒株由来のRNA1とRNA3を持った新しい弱毒株を選抜することが出来る。

## 【0028】

ここで、単一局部病斑分離法について説明すると、単一局部病斑分離法とは、局部病斑一つを次の検定植物に接種して感染させることをいう。すなわち、CMVをキノアやツルナという植物に汁液接種すると、局部病斑というものを形成する。この過程を数回繰り返すと、遺伝的に純粋なCMVを分離することが出来る。一般に、野外から採集してきたCMV感染植物には、数種類の塩基配列が異なるCMVが混合感染している状態になっていると考えられるので、混合感染の状態から純粋なCMVにするために単一局部病斑分離法を使うことができる。

40

## 【0029】

こうして新しい弱毒株を選抜し、ワクチン効果を検査した上で、新しいワクチン株として利用できる。このとき、本発明の情報および2bタンパク質の弱毒変異を利用することになる。

50

## 【0030】

また、ワクチンとして利用する場合は、CMVでは汁液接種（あるいは機械的接種）といって、CMVを含む液を植物に擦り付ける方法で行うことができる。すなわち、ウイルス液を綿に染み込ませ、葉には小さい傷をつけるためにカーボランダムという炭素の粉を撒いておき、上から軽くこする。こうすると、傷口からウイルスが植物細胞に侵入して感染させることが可能となる。なお、ローラー法や、タキイ種苗の開発した接種装置など、大量の苗にワクチンを汁液接種する方法はいくつか存在し、これらを利用しても良い。

## 【0031】

植物においてもヒトや家畜と同じようにウイルスそのものをワクチンとして接種して植物に抵抗性を付与することができるので、ワクチンそのもの及びその作製と2段階で本発明の知識が必要である。

10

## 【0032】

また、当該核酸やポリペプチドを遺伝子組換え技術で植物に組み込んでしまうという方法がある。この場合、通常のアグロバクテリウム法で当該核酸（あるいはその一部）を組み込んだ遺伝子組換え植物を作製すると、当該2bタンパク質を発現する組換え植物が出来る。この組換え植物は、CMVに対して抵抗性になる。

## 【0033】

なお、前記配列表の配列番号1に示す塩基配列と、80%の相同性、好ましくは、90%、より好ましくは95%の相同性を有するものも本発明に含まれる。これらによっても、プローブ等としてスクリーニングに利用することができるからである。

20

## 【0034】

なお、本明細書において、RNAから塩基配列決定をできないので、DNAに変換（cDNA）（逆転写）してから配列決定している。しかしながら、自然界においては、CMVはRNAウイルスとして存在しており、本明細書の配列表の配列番号1に記載のTがUになった配列も、記載しないが、本発明の核酸の範囲に含まれるものである。

## 【0035】

ここで、CMVについて簡単に説明すると以下のようなものである。キュウリモザイクウイルス（Cucumber mosaic virus, 以下CMV）はプロモウイルス科（Bromoviridae）ククモウイルス属（Cucumovirus）に分類され、3分節のss(+)RNAをゲノムとしてもつ、直径約29nmの正二十面体植物病原ウイルスである。CMVが宿主とする植物は、ウリ科、アブラナ科、ナス科などで1000種を超え、その宿主範囲は植物ウイルス最大とされている（Palukaitis et al., 1992）。またしばしば各種野菜類や花卉類に感染して激しいモザイク症状や枯死を引き起こし、生産量や商品価値の低下をもたらす。CMVには宿主域や病徴の異なる系統や変異株が数多く報告されている。これらの分類には血清学的性質の違いとゲノムRNAの塩基配列相同性により、サブグループIA、IB、IIの3つのサブグループに大別される。このようなCMVウイルスの弱毒化のメカニズムを解明できれば、植物ワクチンをはじめ今後の研究に大きな展望を与えることが予想される。

30

## 【0036】

次に、本発明のポリペプチドについては、以下の(a)、又は(b)、すなわち、(a)配列表の配列番号2に示す、アミノ酸配列番号1-857で示されるアミノ酸配列、(b)(a)のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、からなる。このように、アミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸であっても、配列表の配列番号2に記載されたアミノ酸配列と同様に、例えば、プローブとして免疫スクリーニング等に利用することができるので、本発明のポリペプチドに含まれる。

40

## 【0037】

また、本発明のポリペプチドは、以下の(a)又は(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号3に示す、アミノ酸配列番号1-110で示されるアミノ酸配列。

(b) (a)のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列。このように、アミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸であっても、配列表の配列番号

50

3に記載されたアミノ酸配列と同様に、例えば、プローブとして免疫スクリーニング等に利用することができるので、本発明のポリペプチドに含まれる。

【0038】

また、好ましい実施態様において、本発明のポリペプチドは、キュウリモザイクウイルス(以下、CMVともいう)由来の弱毒性を有する。本発明のポリペプチドの利用については、上述したとおりである。例えば、本発明のポリペプチドの情報を用いて、弱毒、強毒株の選別を行い、選別して得られた弱毒株を植物に接種すれば、植物ワクチンとして利用することができる。

【0039】

また、本発明のプローブは、請求項1記載の核酸、すなわち、配列表の配列番号1に記載の核酸からなる。当該プローブは、弱毒性を有する核酸をスクリーニングする場合に用いることができる。

【0040】

また、本発明の突然変異株の生産方法は、配列表の配列番号1に記載の2553番目の塩基配列を、U及びCとの間で点変異させることを特徴とする。これは、本発明者らによって、配列表の配列番号1に記載の2553番目の塩基配列が、CMVの毒性を左右する決定的な因子として見出されたものであり、かかる2553番目の塩基配列を点変異させることにより、強毒性から弱毒性、又は弱毒性から強毒性へと容易に変化させることができる。特に、弱毒性の突然変異体は、その後、強毒性のCMVが感染しても、感染耐性を有しているので、直物ワクチンとしての効果を発揮する。

【0041】

好ましい実施態様において、UからCへ点変異させる。これによって、強毒性を有する突然変異体へ変化させることができる。これに対して、CからUへ点変異させることによって、弱毒性を有する突然変異体へ変化させることができる。当該弱毒性を有する突然変異体は、その後、強毒性を有するCMVに感染しても、強毒性CMVに対する耐性を有しているので、強毒性CMVによる被害を防ぐことができる。

【0042】

また、本発明の組換えベクターは、請求項1記載の核酸を含むことを特徴とする。当該核酸を含む組換えベクターを通じて、強毒性CMVからの被害から守るべき植物細胞へ当該核酸を組み込めば、強毒性CMV耐性を有する植物体を作製することができる。これによって、植物産業のCMVによる被害を安全に防ぐことができる。

【0043】

すなわち、本発明の形質転換体は、請求項1記載の核酸又は請求項9記載の組換えベクターを宿主細胞へ導入して得られる。適当な宿主細胞としては、トマト、キュウリ、タバコなどを挙げることができる。なお、CMVは1000種以上の植物で被害を及ぼしており、広範囲で応用可能である。

【0044】

ここで、植物ワクチンの原理について説明する。基本的に生物細胞には「転写後型ジーンサイレンシング(post-transcriptional gene silencing; PTGS)」とあって、自分自身のRNAや外から侵入してきたウイルス由来のRNAなどで不必要なものを分解する能力がある。しかしウイルスは分解されるといけないので、ジーンサイレンシングを抑制するサプレッサーというタンパク質を作る。CMVの2bタンパク質はこのジーンサイレンシングのサプレッサーである。このサプレッサーが強いと強毒性となり、弱いと弱毒性になると考えられる。このため、強毒株が感染した場合は、強毒株に対するジーンサイレンシングがサプレッサーによって抑制されている状態である。一方、弱毒株を接種した植物はジーンサイレンシングが働いている状態になるので、あとから同種のウイルスの強毒株が侵入してきてもすでにスイッチオンのジーンサイレンシング機能によって強毒株のRNAが分解されてしまうことを利用するのが本発明の原理である。

【0045】

また、本発明の核酸選別用プライマーは、配列表の配列番号1に記載の2553番目の塩基

10

20

30

40

50

を少なくとも含む。このような2553番目の塩基を含んでいれば、当該2553番目の点変異による塩基の変異により生じる毒性の変化を把握することができ、ひいては、植物ワクチンとして使用する場合の、ウイルスの選別手段として用いることができる。なお、プライマーの長さとしては、用途により特に限定されるものではないが、PCR法における $T_m$ 値またはアニーリング温度という観点から、当該2553番目の塩基を含む15～30塩基程度である。

【0046】

また、本発明の核酸は、以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号4に示す、塩基配列番号1 21で示される塩基配列からなる核酸。

(b)前記塩基配列番号1-21の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列と80%の相同性を有する核酸。なお、前記配列表の配列番号1に示す塩基配列と、80%の相同性、好ましくは、90%、より好ましくは95%の相同性を有するものも本発明に含まれる。これらによっても、十分にプローブ等としてスクリーニングに利用することができるからである。

10

【0047】

また、本発明の核酸は、以下の(a)、又は(b)からなることを特徴とする。

(a)配列表の配列番号5に示す、塩基配列番号1 21で示される塩基配列からなる核酸。

(b)前記塩基配列番号1-21の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加されていて、かつ、前記塩基配列と80%の相同性を有する核酸。なお、前記配列表の配列番号1に示す塩基配列と、80%の相同性、好ましくは、90%、より好ましくは95%の相同性を有するものも本発明に含まれる。これらによっても、プローブ等としてスクリーニングに利用することができるからである。

20

【0048】

具体的に、上記核酸、すなわち、配列表の配列番号4及び/又は5に記載の核酸を用いて、キュウリモザイクウイルス(CMV)の毒性を調べることが可能である。すなわち、上記配列番号4及び5に記載のものに限定されることなく、プローブとして、配列表の配列番号1に記載の2553番目の塩基配列を含む適当な長さの塩基配列を用いることにより、CMVが弱毒性であるか強毒性であるかを識別することができる。

【実施例】

30

【0049】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は、下記実施例に限定して解釈される意図ではない。本実施例に用いたCMV-Fuka44(以下Fuka44)、CMV-CM95(以下CM95)は、いずれもサブグループIAのCMVであり、各種の検定植物に対してそれぞれ強毒、弱毒の病原性を示す。

【0050】

CMVはRNA1(約3300bp)、RNA2(約3000bp)、RNA3(約2200bp)と呼ばれる3分節の(+)-一本鎖RNAをウイルスゲノムとして持つ。RNA1、2、3の5'末端にはCap構造が結合し、約300塩基前後の3'末端非翻訳領域の3'末端側はゲノム間で高度に保存された配列を持ち、tRNA様の2次構造をとる。RNA1は約111kDaのタンパク質をコードしており、タンパク質のC末端側には二本鎖の核酸をほどこいて一本鎖にする働きを持つヘリカーゼドメイン、N末端側にはRNAのCap構造付加に關与するメチルトランスフェラーゼ様ドメインが存在する。RNA2は、RNA依存RNAポリメラーゼである約97kDaの2aタンパク質と、細胞質内で核局在性を示して病徴発現やウイルスの全身感染、宿主範囲、ジーンサイレンシング(DNAからRNAへの転写や転写後のmRNA量を抑制する現象)のサプレッサーとして機能すると予想される約13kDaの2bタンパク質をコードする(Li et al., 1999; Lucy et al., 2000)。しかし2bタンパク質は報告されてからまだ歴史が浅く、実際その機能はまだはっきりしていない。1a、2aタンパク質はそれぞれ単独に機能するのではなく、RNA1およびRNA2の感染だけで両RNAが複製する事からRNA1+RNA2が複製最小単位(レプリコン)であることが明らかにされている。またウイルスの複製過程においては、高度に保存された3'端の配列が複製

40

50



酵素の認識部位となっている。

【0051】

RNA3は2つのORFをコードしており、3'側は細胞間移行タンパク質である約30KDaの3aタンパク質、5'側はウイルス粒子を形成し、また細胞間移行や長距離移行にも関与している約25KDaの外被タンパク質(CP)をコードしている。CMVは感染した細胞質内で増殖した後、原形質連絡系を通り隣接する細胞に移行する。その際、原形質連絡系中には3aタンパク質の存在が確認されているが、粒子状態での外被タンパク質は確認されていない。しかしキメラウイルスを用いた実験から細胞間移行には3aタンパク質と外被タンパク質の両方が必要である事が証明されており、そこでRibonucleoprotein複合体すなわちウイルスゲノムRNAに3aタンパク質と外被タンパク質のサブユニットが結合した形で原形質連絡系を通過し、その後外被タンパク質は再び粒子状態に戻り、維管束をとおしての長距離移行に向かうというモデルが提唱されている。しかしこれはあくまで推論であり、確定的ではない。また、3aタンパク質を発現する組み換えタバコのプロトプラスト表面に管状構造物が形成されると報告されており、これは原形質連絡系同様に細胞間移行を介すると考えられている。外被タンパク質は構造タンパク質として核酸分解酵素や物理的な要因からウイルスゲノムを保護する機能だけでなく、上述したようにウイルスの移行、病徴発現、宿主の抵抗性発現やアブラムシ伝搬にも関与している。例えば、CMV感染タバコでの黄色モザイクと緑色モザイクの病徴の違いには外被タンパク質の129番アミノ酸が関与しており、ポリペプチドの高次構造が重要な役割を果たしていると考えられている。アブラムシ伝搬に関与する外被タンパク質のアミノ酸は、モモアカアブラムシ(*Myzus persicae*)により伝搬される場合とワタアブラムシ(*Aphis gossypii*)により伝搬される場合とで異なる。これはアミノ酸の変異によりウイルス粒子の高次構造が変化し、アブラムシに吸汁された時の腸壁への吸着性やウイルス粒子の安定性などに影響し、その事がアブラムシの種類による伝搬性の違いを生じさせると考えられている。

10

20

30

【0052】

またCMVにはサテライトRNA(RNA5)と呼ばれる約330~400塩基からなり、CMVとの組み合わせによって宿主植物の病徴に影響する低分子のRNAを含む分離株もある。サテライトRNAはCMVのゲノムRNAに由来するのではなく、また単独では増殖できないためにウイルスゲノムに依存して複製し、CMV粒子にエンキャプシジョンされる。サテライトRNAの存在により感染植物中でのCMVの濃度が低くなり、さらにアブラムシ伝搬性の能率が落ちると

30

【0053】

このように現在までの世界におけるCMV研究の進展状況から、どのRNAあるいはタンパク質がワクチン効果を決定しているかは全くわからない。

【0054】

そこで、CMVの優良弱毒株(ワクチン)であるCM95の全塩基配列を決定し、これを安定的に保存するために全長cDNAクローンを作製し、さらにこのクローンの塩基配列に変異を導入して弱毒性を決定しているアミノ酸の解明を試みた。

【0055】

本実施例において、まず、CMVの優良弱毒株(ワクチン)であるCM95の作出に用いた元株(Mi)、作出された干渉効果の低い弱毒株(36a1)、干渉効果にすぐれる強毒株(Fuka4-4)、およびの36a1とFuka4-4の混合接種から選抜した優良弱毒株(CM95)の全塩基配列を決定した。その結果、RNA1とRNA2に1箇所ずつ、他のDNAデータベースに登録されているCMVと異なる、弱毒株に特異的なアミノ酸変異を伴う塩基変異を見出した。

40

【0056】

<シュードリコンビナントCMVによる証明>

作製した優良弱毒株CM95の全長cDNAからRNA1~3を転写し、既報の強毒株pepo-CMVのRNA1~3と人工的にリコンビナントを作製して接種実験を行った。その結果、RNA2がCM95であると必ず弱毒性を、逆にRNA2がpepo-CMVであると必ず強毒性を示した。この結果から、RNA2における変異が弱毒性を決定していると考えられた。

50

## 【0057】

< 1塩基変異導入による証明 >

塩基配列の解析から、RNA2がコードする2bタンパク質の弱毒株に特異的な変異が見出された。すなわちRNA2の2553番目の塩基が強毒株はC、弱毒株はU、そしてその塩基が決定する2bタンパク質の46番目のアミノ酸が強毒株はアルギニン(コドンCGU)、弱毒株はシステイン(UGU)に変異していた。そこで、全長cDNAクローンに変異を導入して、その病原性を調べた。

## 【0058】

(1) 作製した優良弱毒株CM95の全長cDNAでRNA2の2553番目の塩基をUからCに変異させて接種したところ、強毒性を示した。

(2) 強毒株pepo-CMVおよびCMV-Yで、CM95のRNA2の2553番目に相当する塩基をからUに変異させて接種したところ、弱毒性を示した。

## 【0059】

以上の結果から、明らかにRNA2の2553番目の塩基が弱毒性・強毒性に関与していることが解明された。

## 【0060】

CMVの2bタンパク質の46番目のアミノ酸がアルギニンからシステインに変異することによってCMVの病原性が大きく低下し、弱毒株(ワクチン)として利用できると考えられる。

## 【0061】

行なった実験手順を以下に示す。

< 全長cDNAクローンの作製法 >

CMV感染葉から抽出したRNAを用いてcDNAを合成した。すなわち、本実験で供試したCMVのゲノムRNA1、2、3に共通の3'末端側塩基配列に特異的な合成プライマーあるいはランダムプライマーを用い、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech) あるいはRNA LA PCR Kit (TaKaRa) で付属の説明書に従いcDNA合成を行った。First-Strand cDNA Synthesis Kitを使用する場合はRNA溶液8μlと3'末端に特異的プライマー、あるいは付属のランダムプライマー1μlを混合し、蒸発を防ぐために流動パラフィンを重ねて95℃で5分間熱変性させた後、速やかに氷上に立て、一本鎖RNAとプライマーをアニーリングさせる。DTT 1μl、Bulk-1st-str Mix 5μlを加え、37℃で1時間反応させた後PCR反応に用いた。PCR反応はKOD Dash (TOYOBO) またはKOD -Plus- (TOYOBO) を用い、付属の説明書に従い行った。PCR反応サイクルは、94℃で熱変性、Tm値から5℃低い温度でアニーリング、68~72℃で伸長反応、という温度変化で30~35回行った。PCRのプライマーは、5'側にはCMVのRNA1~3の5'の配列にT7プロモーターを付加したものを、3'側にはCMVのRNA1~3に特異的なものを作製して用いた。全長cDNAと思われるPCR産物が得られた場合は、定法によってクローニングとシーケンスを行ってその塩基配列を確認した。塩基配列確認後に、T7 DNAポリメラーゼを用いて全長cDNAクローンからRNAを転写し、接種試験に用いた。

## 【0062】

次に、点変異クローンの作出を以下のように行なった。

## 【0063】

Stratagene社のQuickChange Site-Directed Mutagenesis Kitの原理を利用して1塩基の点変異を導入した。すなわちまず、目的とする変異を中央にしてその前後に10-15塩基ずつ付加したプライマー、およびそれに相補的なプライマーを用意する。このプライマーを用い、目的とする変異を導入したいcDNAを含むプラスミドと混合し、正確性の極めて高いPfu DNA PolymeraseでPCR反応(95℃30秒、55℃1分、68℃で1kbあたり2分、このサイクルを5~10回)によってプラスミド全体を一周増幅する。次にPCR反応液にDpn Iを加え、鋳型となったDNA鎖を切断する。Dpn IはAがメチル化された4塩基配列GATCを認識して切断する制限酵素であり、大腸菌内で増殖したプラスミドはメチル化されているのでこの酵素により切断されるが、PCR産物は切れない。Dpn Iで切断後そのまま大腸菌を形質転

10

20

30

40

50

換すると、PCRで増幅された変異のはいったものが導入された大腸菌だけが生えてくる。ニックは形質転換後に修復される。このようにして得られたプラスミドについては、目的とした塩基以外に変異が入っていないことをシーケンスにより確認したのち、RNAを転写して接種試験に用いた。

【産業上の利用可能性】

【0064】

本発明は、天然のウイルスを利用するので、極めて安全に、いわゆる植物ワクチンを提供でき、また、弱毒化のメカニズムを提供することができるので、農学、生物化学、生化学等の分野において広く有用性が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】図1は、キュウリモザイクウイルス(CMV)のゲノム構造を示す。

【図2-1】図2は、CMVのCM95のRNA2の全塩基配列を示す。

【図2-2】図2は、CMVのCM95のRNA2の全塩基配列を示す。

【図3-1】図3は、全塩基配列とコードされている2a、2bタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【図3-2】図3は、全塩基配列とコードされている2a、2bタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【図3-3】図3は、全塩基配列とコードされている2a、2bタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【図3-4】図3は、全塩基配列とコードされている2a、2bタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【図3-5】図3は、全塩基配列とコードされている2a、2bタンパク質のアミノ酸配列を示す。

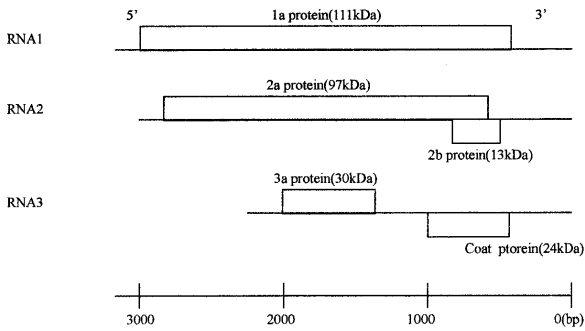
【図4】図4は、2aタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【図5】図5は、2bタンパク質のアミノ酸配列を示す。

10

20

【 図 1 】



【 図 2 - 1 】

ワクチン株CM95のRNA2の全塩基配列とコードされている2a、2bタンパク質のアミノ酸配列(特許申請の2bタンパク質中のアミノ酸を赤で示す)

(1) 全塩基配列

```

GTTTATTAC AAGAGCGTAC GGTGAACCC CTGCTCCTC TGTAAAACTC 50
CCTAGACTTT AAAACTTCIT TCTAGTATCT TTCTGATGGC TTCTCCGCC 100
CCCGATTCT CACTAGCCAA TCITTTGAAT GGTAGTAGC GTGTGAGAC 150
TCCCGAGGAT GTGGAACGCT TGGGATCTGA GCAACGGGAA GAGGCTGCC 200
CGGCTGCCG TAATTACAGG CCTTACCCG CTGTGGATGT CAGCGAGAGT 250
GTCACAGAGG ACGCGCATTC CCTCCAACT CCTGACGGAG CTCGCCCTGA 300
AGCGGTGCT GATGAGTTG TAACCTATGG TCGTGAAGAT TACCTGAAA 350
AATCTGATGA TGAGTCTCTT GTCGCTTTTG ACACGATGGT CAAACCATG 400
CGTATGGAC AACTATGGTG CCTGCGTTT AATAAATGTT CTTTATTTC 450
CAGGATTGCT ATGGCCAGAG CTTTCTGCTT GGCACCTAGA ACATCCACC 500
GAACCATGAA GTGTTTGAA GACCTGGTC CGGCTATTTA CACTAAATCT 550
GATTTCTATT ACAGTGAAGA GTTGAACCC GAGCCGTTCC AGATGATAT 600
CTCGTCTGC GATGTACCG GTTATTCTTT CGAACCGTGG TCCCGAAGCT 650
CTGGATTGCA ACCGCCGCC ATTTGTGAAG CGTGGACAT GATCATGTAC 700
CAGTCCCGT GTTTGATTT CAATGCTTA AAAAAACGT CGCTGAGAG 750
GACTTTCGCT GATGATTATG TTATTGAAGG TTTAGATGCT GTTGTGATA 800
ATCCGACTCT GTTGTGAAAT TTGGTCCAT TTTTGTACC CGTGAAGTGT 850
CAATATGAAA AATGCCAAC GCCAACCATC GCGATTCTCC CGAATTTAAA 900
TCCTGCCACT GATCTGTTG ATATCAATTT ACTTCAATCC ATTTGTGACT 950
CGACTCTGCC CACTCATAGT AACTATGACC ACTCTTTTCA CAAAGTGTTC 1000
GTCGAAAGTC CAGATTACTC CATAGATCTC GATCATCTTA CACTTCGACA 1050
GCTGATCTTT ATTGCAAAA TTCCAGACTC AGGGCATATG ATACCGGTT 1100
TGAACACCGR GAGCGGTCA C AAGACAGTAG GTACACGAA GAGGTTCIT 1150
ACAGCAATTA AGAAACGTAA TGCTGACGTT CCGAGCTAG GTGATTCCGT 1200
TAATCTGCT AGATTGAGTA AAGCTGTGCG TGAGACATTC TGCATTTTAT 1250
ACATCAATGG TAACCTCTTA GCATCCAGCA ACTTTGTCAA TGTCTGTAGT 1300
AATTTCCAGC ATTACATGGA CAATGGAAA TCCTCAGGTC TTCTTATGA 1350
TGATCTTCCA GATCTTCATG CTGAAAATTT GCAGTTTTAT GATCAGATGA 1400
TAAAATCTGA TGTGAAACCT GTGGTAGGCG ACACACTCAA TATCGACAGA 1450
CCGGTCCAG CTACTATAAC GTATCATAAG AAGATATAA CCTCCAGTT 1500
CTCACGTTA TTCACAGCCG TATTCCAGCC CTCCAGAGA TCCCTTCGAG 1550
AACGTATTAT TCTTCTCTTT GGTAAAGATT CATCTCTTGA GATGCCAGGA 1600
TTTGATGCA AAAACAGTA CTGCTCGAG ATTGATTTGT CTAAGTTTGA 1650
TAAGTCTCAA GGTGAATTC ACTTACTAAT TCAGGAACAT AITTTGAATG 1700
GTCTAGGATG TCCAGCTCCG ATAACCAAGT GGTGGTCCGA TTTCACCGA 1750
TTCTCTTACA TCAGAGACCC TAGAGCTGGT GTTGTATGTC CTATTAGTGT 1800
CCAGAGACGA ACTGGTAGTG CATTCACTTA TTTTGGCAAT ACCATTGTCA 1850
CCATGGCTGA GTTTCCTGGG TGTATGACA CCGATCAATT CGAAAGACTT 1900

```

【 図 2 - 2 】

```

TTATTCTCAG GCGATGACTC TCTAGGATTT TCACAGCTTT CCCCTGTGG 1950
TGATCCGAGT AAATTCACGA CTCITTTACA CATGGAAGCT AAGGTGATGG 2000
AACCATCAGT ACCATATATC TGTTCGAAGT TCTTACTCTG TGACGAGTTC 2050
GGTAACACAT TTTCCGTTCC AGATCCATTG CCGCAGGTTCC AGCGTTTAGG 2100
AACAAAGAAA ATTCCCTATT CCGACAATGA TGAATTCCTG TTTGCTCACT 2150
TCATGAGCTT TGTGATCGA TTGAAGTTT TGGACCGAAT GTCTCAGTCC 2200
TGATTCGATC AACTTTCGAT TTTCTTTGAA TTGAAATACA AGAAGTCTGG 2250
GGAAGAGGCT GCTTTAATGT TAGCCGCCCT TAACAAATAT ACCGCTAATT 2300
TCCAGTCCCT CAAAGAACTC TATTATTGAG ATCGCTGCTA GTGCGAATTG 2350
ATCAATTGCT TTTGTAGTAC AGATTCAGG GTTGAGCGTA TAAATTCCAA 2400
TAAACAGCGA AAGAAACATG GAATTGAACC TAGGCCGAT GACAAACGTC 2450
GAACTCCAAC TGCTCGTAT GCTGGAGGCC AAGAAGCAGA GACGAAGTCC 2500
TCACAGCAG AATCGACGGG AACGAGTCA CAAAAGTCCC ACGGAGAGAG 2550
CGTGTTCAAA TCTCAGACTG TTCCGCTTCC TACCGTCTTA TCAAGTGGAT 2600
GGTCCGGAAC TGACAGGCTC ATGCCGCCAT GTGAACGTGG CCGAGTTACC 2650
CGAGCCTGAG GCCTCTCGTT TAGAGTTATC GCGCGAAGC CATGATTTTG 2700
ACGATACCGA TTGGTCCGC GGTAAACGAA GGGCGAAGG TACTTTCTGA 2750
ACCCCTCCTT CTCTCCCTC CGGTTTGTGG CCGGAGCTGA GTTGGCAGTA 2800
TTGCTATAAA CTGTCTGAAG TCACATAACA CATTGTGGTG AACGGTGTG 2850
CCATCCAGCT TACGGCTAAA ATGGTCAGT GTAGAGAAAT CTACGCCACG 2900
AAACTTACAA GTTTCTGAGG CACCTTTGAA ACCATCTCT AGTTTTCTTC 2950
GGAAGGACTT CGGTCCGTGT ACTTCTAGCA CAACGTGCTA GTTTCAGGGT 3000
ACGGGTGCC ACCTTTCGTG GGGGGCCCTC TAAAAGGAGA CCA 3043

```

【 図 3 - 1 】

(2) 全塩基配列とアミノ酸配列

Translation Position: 86 - 2659; 2418 - 2750;  
Genetic Code : Universal

```

1 GTTTATTACAAGAGCGTACGGTTCAACCCCTGCTCCTCTGTAACACTCCCTAGACTTT 60
61 AAAACTTCTTTCTAGTATCTTTTCTATGGCTTTCTCCGCCCGGATTCCTACTAGCCAA 120
METAlaPheSerAlaProAlaPheSerLeuAlaAsn
121 TCTTTGAATGGTAGTTACGGTGTCCGACACTCCCGAGGATGTGGAACGCTTCCGATCTGA 180
LeuLeuAsnGlySerTyrGlyValAspThrProGluAspValGluArgLeuArgSerGlu
181 GCAACGGCAAGAGGCTCCGCCGCCCTCCGTAATTCAGGCCCTTACCCGCTGTGGATGT 240
GlnArgGluGluAlaAlaAlaCysArgAsnTyrArgProLeuProAlaValAspVal
241 CAGCGAGAGTGTACAGAGGACGGCATCCCTCCAACTCCTGACGAGCTCCCGCTGA 300
SerGluSerValThrGluAspAlaHisSerLeuGlnThrProAspGlyAlaProAlaGlu

```

【 3 - 2 】

301 AGCGGTGCTGATGAGTTTGAACCTTGGTGGCAAGATACCTGAAAAATCTGATGA 360  
AlaValSerAspGluPheValThrTyrGluAlaGluAspTyrLeuGluLysSerAspAsp

361 TGAGCTCCTTGTCCGTTTGGACAGCATGGTCAAACCCATCGGTATCGACAACATCGTG 420  
GluLeuLeuValAlaPheGluThrMETValLysProMetArgIleGlyGlnLeuTrpCys

421 CCCTGCGTTTAAATAATGTTCTTTTATCCGACATGCTATGGCCAGACGTTTGTCTGT 480  
ProAlaPheAsnLysCysSerPheIleSerSerIleAlaMETAlaArgAlaLeuLeuLeu

481 GGCACCTAGAACATCCCACCGAACCATGAAGTGTGTAAGACCTGGTCCGGCTATTTA 540  
AlaProArgThrSerHisArgThrMETLysCysPheGluAspLeuValAlaAlaIleTyr

541 CACTAAATCTGATTTCTATTACAGTGAAGAGTGTGAAGCCGACGCTTCAGATGGATAT 600  
ThrLysSerAspPheTyrTyrSerGluGluCysGluAlaAspValAlaGlnMETAspIle

601 CTGCTCCGGATGATACCGGTTTATTTTCAACCGTGGTCCGACGCTGGATTCGA 660  
SerSerArgAspValProGlyTyrSerPheGluProTyrSerArgThrSerGlyPheGlu

661 ACCGCCGCCATTTGTAAGCCGCGACATGATCATGTCCAGTCCCGCTGTTTGTATT 720  
ProProProIleCysGluAlaCysAspMETIleMETTyrGlnCysProCysPheAspPhe

721 CAATGCTTTAAAGAAAACGTCGCGTGAAGCAGCTTTCGCTGATGATTATGTTTGAAG 780  
AsnAlaLeuLysLysThrCysAlaGluArgThrPheAlaAspAspTyrValIleGluGly

781 TTTAGATGGTGTGATGATAACCGACTGTTGTCGAATTTGGGCCATTTTGTGATCC 840  
LeuAspGlyValValAspAsnAlaThrLeuLeuSerAsnLeuGlyProPheLeuValPro

841 CGTGAAGTGTCAATGAAATGCAACCGCAACCATCGCATTCCTCCGAATTTAAA 900  
ValLysCysGlnTyrGluLysCysProThrProThrIleAlaIleProProAsnLeuAsn

901 TCGTCCACTGATCGTGTGATCAATTTAGTTCATCCATTTGACTCGACTCGCC 960  
ArgAlaThrAspArgValAspIleAsnLeuValGlnSerIleCysAspSerThrLeuPro

961 CACTCATAGTAACATGACGACTCTTTCTCAAGTGTTCGCAAAAGTGCAGATTACTC 1020  
ThrHisSerAsnTyrAspAspSerPheHisGlnValPheValGluSerAlaAspTyrSer

1021 CATAGATCGGATCATGTTAGACTTCGACAGCTGATCTTATGCAAAAATCCGACTC 1080  
IleAspLeuAspHisValArgLeuArgGlnSerAspLeuIleAlaLysIleProAspSer

1081 AGGGCATATGATACCGCTTCTGAACCCGGAGCGGTCAAGAGAGTGTACAACGAA 1140  
GlyHisMETIleProValLeuAsnThrGlySerGlyHisLysArgValGlyThrThrLys

【 3 - 4 】

1981 CATGGAAGCTAAGGTGATGGAACCATCAGTACCATATATCTGTGCAAGTCTTACTCTC 2040  
METGluAlaLysValMETGluProSerValProTyrIleCysSerLysPheLeuLeuSer

2041 TGACGAGTTCGGTAAACATTTCCGTTCCAGATCCATTCGCGGAGGTTGACGCTTAGC 2100  
AspGluPheGlyAsnThrPheSerValProAspProLeuArgGluValGlnArgLeuGly

2101 AACAAAGAAAATCCCTATCCGCAATGATGAATTTGTTGCTCACTTCATCAGCTT 2160  
ThrLysLysIleProTyrSerAspAsnAspGluPheLeuPheAlaHisPheMETSerPhe

2161 TGTGATCGATGAAGTTTGGACCGAATGTCTCAGTGTGTATCGATCAACTTTCGAT 2220  
ValAspArgLeuLysPheLeuAspArgMETSerGlnSerCysIleAspGlnLeuSerIle

2221 TTTCTTTGAATGAAATACAAGAGTCTGGGAAGAGGCTGCTTTAATGTTAGGCGCCT 2280  
PhePheGluLeuLysTyrLysLysSerGlyGluAlaAlaLeuMETLeuGlyAlaPhe

2281 TAAGAAATATACCGCTAATTTCCAGTCTCAAAAAGACTCTATTATTCAGATCGCTGCA 2340  
LysLysTyrThrAlaAsnPheGlnSerTyrLysGluLeuTyrTyrSerAspArgArgGln

2341 GTGCGAATTGATCACTTCTTTGCTAGTACAGAGTTCAGGTTGACCGTATAAATCCAA 2400  
CysGluLeuIleAsnSerPheCysSerThrGluPheArgValGluArgIleAsnSerAsn

2401 TAAACAGCGAAGAAACATGGAATTGAACGTAGCCGCGATGACAAACGTCGAACTCCAAC 2460  
LysGlnArgLysLysHisGlyIleGluArgArgAspAspLysArgArgThrProThr  
METGluLeuAsnValGlyAlaMETThrAsnValGluLeuGlnLeu

2461 TGGCTCGTATGTTGGGAGGAAGAAGCAGAGCAAGGCTCTCAAGCAGAGATCGACGGG 2520  
GlySerTyrGlyGlyGluGluAlaGluThrLysValSerGlnAlaGluSerThrGly  
AlaArgMETValGluAlaLysLysGlnArgArgSerHisLysGlnAsnArgArgGlu

2521 AACCGAGTCAACAAGTCCGCGAGAGCGGTTCAAATCTCAGACTGTTCCGCTTCC 2580  
ThrArgSerGlnLysSerGlnArgGluSerValPheLysSerGlnThrValProLeuPro  
ArgGlyHisLysSerProSerGluArgAlaCysSerAsnLeuArgLeuPheArgPheLeu

2581 TACCGTCTTCAAGTGGATGGTCCGGAACGACAGGCTGACCGCCATGTGAACGCTGG 2640  
ThrValLeuSerSerGlyTrpSerGlyThrAspArgValMETProProCysGluArgGly  
ProPheTyrGlnValAspGlyProGluLeuThrGlySerCysArgHisValAsnValAla

2641 CGGAGTTACCCGAGCCTGACGCGCTCTGTTAGAGTTATCGCGGAAGACCATGATTTTG 2700  
GlyValThrArgAla\*\*\*  
GluLeuProGluProGluAlaSerArgLeuGluLeuSerAlaGluAspHisAspPheAsp

【 3 - 3 】

1141 GGAGTTCTTACAGCAATTAAGAACTAATGCTGACGTCCAGAGCTAGTGATTCCTG 1200  
GluValLeuThrAlaIleLysLysArgAsnAlaAspValProGluLeuGlyAspSerVal

1201 TAATCTGTCTAGATTGAGTAAAGCTGGCTGAGAGATCTTCATTCATACATCAATGG 1260  
AsnLeuSerArgLeuSerLysAlaValAlaGluArgPhePheIleSerTyrIleAsnGly

1261 TAATCTCTAGCATCCGCAACTTTGCAATGCTGTAGTAATTTCCAGATACATGGA 1320  
AsnSerLeuAlaSerSerAsnPheValAsnValValSerAsnPheHisAspTyrMETGlu

1321 GAAGTGAATCCTCAGGCTTTCTTATGATGATCTCCAGATCTTCGCTGAAAATTT 1380  
LysTrpLysSerSerGlyLeuSerTyrAspAspLeuProAspLeuHisAlaGluAsnLeu

1381 GCAGTTTTATGATCAGATGATAAATCTGATGTAACCTGGTGGCAGCACACTCAA 1440  
GlnPheTyrAspHisMETIleLysSerAspValLysProValValSerAspThrLeuAsn

1441 TATCGACAGCCGGTCCAGCTACTATAACGTATCAAGAAGATATAACCTCCAGTT 1500  
IleAspArgProValProAlaThrIleThrTyrHisLysLysSerIleThrSerGlnPhe

1501 CTCACCGTTATTCACAGCGCTATTCGAGCGCTCCAGAGATCCCTCGAAGCACTTAT 1560  
SerProLeuPheThrAlaLeuPheGluArgPheGlnArgCysLeuGluArgIleIle

1561 TCTTCTGTGGTAAGATTTCTCTTGTAGATGGCAGGATTTGATGCAAAAACAAGTA 1620  
LeuProValGlyLysIleSerSerLeuGluMETAlaGlyPheAspValLysAsnLysTyr

1621 CTGCTCGAGATTGATTTGTCTAAGTTGTAAGTCTCAAGTGAATTTCACTACTAAT 1680  
CysLeuGluIleAspLeuSerLysPheAspLysSerGlnGlyGluPheHisLeuLeuIle

1681 TCAGGAACATATTTGAATGCTAGGATGTCAGCTCCGATAACCAAGTGGTGGCGCA 1740  
GlnGluHisIleLeuAsnGlyLeuGlyCysProAlaProIleThrLysTrpTrpCysAsp

1741 TTTCCCGGATCTTACATCAGACCCGTAGAGCTGGTGTGGTATGCTTATGATTT 1800  
PheHisArgPheSerTyrIleArgAspArgArgAlaGlyValGlyMETProIleSerPhe

1801 CCAGACAGCAACTGGTATGCTACTTACTATTTGGCAATACCACTTCCACATGGCTGA 1860  
GlnArgArgThrGlyAspAlaPheThrTyrPheGlyAsnThrIleValThrMETAlaGlu

1861 GTTTCGCTGGTCTTATGACACCGTCAATTCGAAAGCTTTTATTCGACCGCATGACT 1920  
PheAlaTrpCysTyrAspThrAspGlnPheGluLysLeuLeuPheSerGlyAspAspSer

1921 TCTAGGATTTTACAGCTTTCCCTGTTGGTATCCGAGTAAATTCACGACTTCTACAA 1980  
LeuGlyPheSerGlnLeuSerProValGlyAspProSerLysPheThrThrLeuTyrAsn

【 3 - 5 】

2701 ACGTACCGGATGGTTCGCGGTAACGAATGGCGGAAGTACTTCTGAAACCTTCTCT 2760  
AspThrAspTrpPheAlaGlyAsnGluTrpAlaGluGlyThrPhe\*\*\*

2761 CTTCTCCCTCCGGTTTGTGGCGGAGCTGAGTGGCAGTATGCTATAAATGTCTGAAG 2820

2821 TCACTAAACACATTGTGGTGAACGGTTGTCCATCAGCTTACCGCTAAAATGGTCAGTC 2880

2881 GTAGAGAACTACCGCAGCAAACTTACAAGTTTCTGAGGCACCTTGAACCATCTCCT 2940

2941 AGGTTCTTCGGAAGGACTTCGGTCCGTACTCTAGCACAACGCTGATGTTTACGGGT 3000

3001 ACGGGTCCCACTTTCGTTGGGGGGCCTCTAAAAGGAGACCA 3043

【 4 】

(3) 2a タンパク質のアミノ酸配列  
MAFSAPAFSLANLLNGSYCVDPEDVRLRSEQRREAAACRNYRPLPAVDVSESVTEAHSLLQPDGAPAEAVSDFVYGAEDY  
LEKSDDELLVAFETMVKPWRIGLWCPAFNKCSFSSIAMARALLLPRTSHRTMKCFEDLVAIYTKSDFYSECEADVDQMDI  
SSRDVPGYSFEPWSRTSGFEPPICEACDMIMYQPCDFNALKTKCAERTFADDYVIEGLDGVONATLLSNLGFLLVPVKQYE  
KCPTPTIAPPNLNRATORVDINLVQSIDSTLPTHSNYDPSFHQVWESADYSIDLHVRRLQSDLAKIPDSGHMIPVLTGSG  
HKRVGTKEVLTAKIKRNADVPELGDVNLRLSKAVAEFFSYINGNSLASSNFVMSFHDYMEKNKSSGLSYDDLPDLHAE  
NLQFDHMIKSDWPKVSDLINDRPPIPATITYHKKSISQFSPLFTALFERFRQLRERIILPVCKISSELMAGFDYKNKYLEI  
DLSKFDKSGEFHLLIQEHLNLGLCPAPITKWWDFHRFSYIRDRRAGVGMPI SFQRRTGDAFTYFGNITVITMAEFAWCDYDQF  
EKLFSQDSDLGFSQLSPVGDPSKFTLYNWEAKVMPSVPIICSKFLLSDFGNTFSVPDLREVRLGTTKIPYSNDDEFLFAH  
FMSFVDRKFLDRMSQCIDQLSIFFEKLYKKSQEEAALMLGAFKTYANFQSYKELYSDRRQCELINFSCTEFVRERINSNKQ  
RKKHGIERRDDKRRTPTCGYCGEEAEKVSQAESTGRSRQSRQSVKFSQVPLPVLVSSGWSGDRVMPPCERGGVTRA

【 5 】

(4) 2b タンパク質のアミノ酸配列  
MELMVGAMTNVELQLARINVEAKQRRRSHKQNRERGHKSPSERACISMLRIFRFLPFYQDQPELTCSCRHWVVAELPEPEASRLS  
LSAEDHDFDDTDFWAGNEWAEQTF

【配列表】

2005270021000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/04	
C 1 2 N 7/04	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 Q 1/70	C 1 2 N 5/00	A
(74)代理人 100119530 弁理士 富田 和幸		
(74)代理人 100123652 弁理士 坂野 博行		
(72)発明者 夏秋 知英 東京都文京区本駒込5 - 3 - 3 - 1 0 0 4		
(72)発明者 小坂 能尚 京都府亀岡市大井町かすみヶ丘7 - 1 4		
(72)発明者 小堀 崇 奈良県奈良市中登美ヶ丘1 - 4 1 6 2 - 1 中登美団地E 8 - 4 0 1		
Fターム(参考) 4B024 AA07 AA11 BA32 CA04 CA09 CA20 DA01 EA01 GA11 HA01 HA12 4B063 QA01 QA05 QQ10 QQ41 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 4B065 AA88X AA95Y AB01 AC20 BA02 BA14 CA24 CA47 CA60 4H045 AA10 BA10 CA01 DA83 EA05 FA74		