

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6129748号
(P6129748)

(45) 発行日 平成29年5月17日 (2017.5.17)

(24) 登録日 平成29年4月21日 (2017.4.21)

(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 5/09 (2010.01)	C 1 2 N 5/09
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 7/06 (2006.01)	C 1 2 N 7/06
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70

請求項の数 16 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-548625 (P2013-548625)	(73) 特許権者 506178335 アメリカ合衆国
(86) (22) 出願日 平成24年1月10日 (2012.1.10)	アメリカ合衆国 メリーランド州 ロック ビル スイート 325 エグゼクティブ ブ ブールバード 6011 オフィス オブ テクノロジー トランスファー
(65) 公表番号 特表2014-509839 (P2014-509839A)	(73) 特許権者 513173958 ロイヤル コーンウォール ホスピタル トラスト
(43) 公表日 平成26年4月24日 (2014.4.24)	英国 コーンウォール州 トルロー
(86) 国際出願番号 PCT/US2012/020830	(74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号 W02012/096999	(74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫
(87) 国際公開日 平成24年7月19日 (2012.7.19)	
審査請求日 平成26年10月30日 (2014.10.30)	
(31) 優先権主張番号 61/431,377	
(32) 優先日 平成23年1月10日 (2011.1.10)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 61/554,323	
(32) 優先日 平成23年11月1日 (2011.11.1)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染性E型肝炎ウイルス遺伝子型3の組換え体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 5に示すE型肝炎ウイルス(HEV)核酸配列に関して、ORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に挿入断片を含む、感染性HEV 3型cDNAクローンであって、該挿入断片が、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも90%の同一性を有するインフレームのアミノ酸配列をコードする、感染性HEV 3型cDNAクローン。

【請求項2】

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9を含むアミノ酸配列をコードする、請求項1記載の感染性HEV 3型cDNAクローン。

【請求項3】

前記挿入断片によってコードされる最初のアミノ酸がSEQ ID NO: 6に関して750位に存在するように、該挿入断片がORF1の超可変領域中に配置される、請求項1または請求項2記載の感染性HEV 3型cDNAクローン。

【請求項4】

SEQ ID NO: 1に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、かつSEQ ID NO: 5に示すHEV核酸配列に関して、ORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に挿入断片を含む、複製するE型肝炎ウイルス(HEV) 遺伝子型3 cDNAクローンであって、該挿入断片が、インフレームのアミノ酸配列をコードする87ヌクレオチドまたは90ヌクレオチドのセグメントであって、該アミノ酸配列がSEQ ID NO: 9の5'の半分、SEQ ID NO: 9の3'の半分、または、SEQ ID NO: 9の中央部分である、複製するHEV 3型cDNAクローン。

【請求項 5】

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列をコードする、請求項4記載のHEV 3型cDNAクローン。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 1に対して少なくとも95%の同一性を有する、請求項4記載のHEV 3型cDNAクローン。

【請求項 7】

SEQ ID NO: 1の核酸配列を含む、請求項4記載のHEV 3型cDNAクローン。

【請求項 8】

pSK-E2 (GenBank アクセッション番号AF444002) の超可変領域に関してORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に挿入断片を含み、かつ該挿入断片が、SEQ ID NO: 9のインフレームのアミノ酸配列をコードする、複製するE型肝炎ウイルス(HEV)遺伝子型1 cDNAクローン。

10

【請求項 9】

請求項1~8のいずれか一項記載のcDNAクローンを含む細胞を含む、細胞培養システム。

【請求項 10】

請求項1~8のいずれか一項記載のcDNAクローンから得られたRNAを細胞中に導入する段階、および、該RNAによって産生されたウイルスを得る段階を含む、ワクチンを作製する方法。

【請求項 11】

前記RNAをウイルス粒子として前記細胞中に導入する、請求項10記載の方法。

20

【請求項 12】

前記細胞がMRC5肺細胞である、請求項10記載の方法。

【請求項 13】

以下の段階を含む、ワクチンを作製する方法:

請求項1~8のいずれか一項記載のcDNAクローンから得られたRNAを細胞株中に導入する段階であって、該RNAがORF3を産生することができない、段階;および

該RNAによって産生されたウイルスを得る段階。

【請求項 14】

以下の段階を含む、ウイルス処理工程に供された関心対象の製品のウイルス状態を評価する方法:

30

請求項1~8のいずれか一項記載のcDNAクローンを用いて産生させたHEVウイルスを、該製品に添加する段階;

該製品を、該製品中に存在するウイルスを除去および/または不活性化するウイルス処理工程に供する段階;ならびに

該ウイルス処理工程の後または最中に残存している添加されたウイルスの該製品中のレベルを測定する段階。

【請求項 15】

前記関心対象の製品が、水、血液、または、動物が摂取するための食物である、請求項14記載の方法。

40

【請求項 16】

前記食物が、ヒトが摂取するためのものである、請求項15記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年11月1日に出願された米国特許仮出願第61/554,323号および2011年1月10日に出願された米国特許仮出願第61/431,377号の恩典を主張し、これらの各出願は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

50

アスキーテキストファイルとして提出された配列表の参照

2012年1月10日に作成したファイル77867-827343_SEQLIST.TXT、62,887バイト、機械の型:IBM-PC、オペレーティングシステム:MS-Windowsに書き込まれた配列表は、その全体をあらゆる目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

E型肝炎ウイルスは、発展途上国における急性肝炎の流行および散発的症例の原因として悪名を得た。例として、1956年のニューデリーでの大流行中に起こった29,300例、および、以前に報告された(1)妊婦の死亡率が26~31%と最も高かった(2)、ダルフルの国内避難民キャンプ(Internally Displaced Persons Camp)において6ヶ月間にわたって報告された2,621例が挙げられる。HEVは、発展途上国における成人の急性肝炎の最もまたは2番目に重要な原因である。しかし、最近の定説とは異なり、このウイルスは発展途上国に限定されておらず、散発的症例が、感染拡大の可能性に対する認識として工業先進国において次第に認められつつあり、このウイルスに関する試験が実施されている。

10

【0004】

歴史的に、E型肝炎は、慢性的には決して進行しない、経腸的に伝染する自己限定的肝炎として説明されていた(3)。しかしながら、最近、慢性E型肝炎が初めてヨーロッパで確認され、それ以来、免疫無防備状態の実質臓器移植レシピエントおよびHIV感染個体において慢性が実証されている(4、5、6、7)。通常、E型肝炎感染は軽度~中度の疾患を引き起こすが、急性例において、慢性感染患者において、特に、慢性肝臓疾患を基礎疾患として有する者または妊娠している者において、劇症肝不全を時折引き起こした(1、2、4、5、6、7、8)。さらに、E型肝炎は薬物性肝障害と誤診され、そのため、薬物試験または治療計画を複雑にしてきた(9)。1983年に発見されて以来、文書に記録されたHEV伝染は、ほぼ例外なく、汚染水と関連があった。調理していないシカ肉の摂取後のHEV感染の発見によって不意にこれが変わった(10、11)。現在、E型肝炎は、発展途上国の水系感染症としてだけでなく、工業先進国の新たに出現した食品伝染疾患としても認識されている(11、12)。

20

【0005】

HEVは、ゲノムサイズ7.2kbの、エンベロープを持たない小型の一本鎖RNAウイルスである(3)。HEVの7.2kbゲノムは、3つの重なり合ったリーディングフレーム(ORF)を有する一本鎖プラスセンスRNAである。最初の約5kbは、ORF1ポリタンパク質のためのmRNAとして働く。このポリタンパク質がタンパク質分解によってプロセッシングされるかは公知ではない。ORF1は、メチルトランスフェラーゼ/グアニリルトランスフェラーゼ、NTPアーゼ/ヘリカーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼ、およびユビキチン化活性をコードする領域を含む。さらに、ORF1は、機能が未知であるY領域およびXまたはマクロ領域ならびにORFの中央近くに位置する超可変領域(HVR)をコードする。HVRは、株および遺伝子型によって長さおよび配列が異なる。これは、小規模の欠失は許容するが、細胞培養における複製レベルは大幅に低下する。ORF2およびORF3は、単一のバイシストロン性サブゲノムRNAから翻訳されて、アミノ酸660個のカプシドタンパク質およびアミノ酸113~114個のタンパク質をそれぞれ産生する。ORF3タンパク質は、培養細胞からのウイルス粒子の効率的放出のために重要であり、マカクの感染に必要とされる。

30

40

【0006】

これまで、ヒトに感染する4種のHEV遺伝子型が認識されている(17)。遺伝子型1および遺伝子型2の感染は、もっぱらヒトで確認されているのに対し、遺伝子型3および遺伝子型4のウイルスは、ヒトのほかにブタ、シカ、マングース、ウシ、およびウサギから単離されている(18)。遺伝子型3および遺伝子型4はブタに遍在し、十分に加熱調理されていない豚肉は、ヒトの人畜共通感染症の主要原因であり得る(12、18)。しかしながら、異種間伝染は徹底的には研究されておらず、人畜共通感染症のその他の病原体保有体が存在する可能性が高い。

50

【0007】

HEV感染は、2～7週間続き、慢性的には決して進行しない急性感染症であると長い間考えられていた。しかしながら最近、免疫抑制された臓器移植患者またはエイズ患者において慢性HEV感染が確認されている。さらにより意外なことには、これらの慢性的に病気の患者の一部は神経学的症状を示し、HEVは脳脊髄液から単離された。これらの慢性例は、遺伝子型3感染症であることが確認されている。

【0008】

HEVは通常、インビボで複製すると低力価になり、培養細胞中で増殖させることは非常に難しく、ウイルス生活環の多くは不明である。Okamotoおよび同僚は最近、2種のヒト細胞株、すなわちA549肺細胞およびPLC/PRF/5肝癌細胞において高力価になるまで複製する

10

【0009】

HEVに関する疫学は、理解にはほど遠く、特に、人畜共通感染的的局面はさらなる研究を要する。したがって、細胞培養において複製できるHEV遺伝子型株を開発する必要がある。さらに、HEVワクチン、例えば、遺伝子型3株に対するワクチンを開発する必要もある。

【0010】

本発明は、ヒト肝癌細胞中で増殖するように順応させられ、かつHEV感染を許容するヒト細胞培養物、ブタ細胞培養物、およびシカ細胞培養物の集団を同定するのに使用された、慢性感染患者から単離された遺伝子型3ウイルスの発見(5)に部分的に関する。本発明はさらに、細胞培養において複製する能力を与える配列変化を特定するための、順応させた

20

【発明の概要】

【0011】

上記に説明したとおり、E型肝炎は最近まで工業先進国ではめったに確認されていなかった。現在、E型肝炎の報告が、西ヨーロッパ、東ヨーロッパのいくつかの国、および日本の全域にわたって増えており：これらの症例の大半は、ブタに固有である遺伝子型3によって引き起こされ、これらの症例は人畜共通感染的にもたらされると考えられている。しかしながら、伝染経路は十分に理解されていない。ヒトに感染するHEVは、人畜共通感染性ではない遺伝子型(1型、2型)および人畜共通感染性遺伝子型(3型、4型)に分類される。HEV細胞培養は非効率的かつ限定的であり、これまでは、HEVはヒト細胞株においてのみ培養されてきた。

30

【0012】

本発明は、HEV遺伝子型3ウイルスの新規株の同定に部分的に関する。慢性感染患者から単離されたHEVのKernow-C1株(遺伝子型3)を用いて、感染を許容するヒト細胞株、ブタ細胞株、およびシカ細胞株を同定した。ヒト肝癌細胞中の増殖に対してKernow-C1株を適応させて、ヒトリボソームタンパク質遺伝子のリボヌクレオチド174個(アミノ酸58個)の挿入と、さらなる変異とを含む珍しいウイルス組換え体を選択した。本発明において、実施例のセクションで説明する実験において同定されるリボヌクレオチド174個の挿入物を考察するにあたって、Kernowウイルスゲノム中への挿入断片は、それ自体では57個のアミノ酸しかコードできない、171個のリボヌクレオチドを含んだ。しかしながら、これは、ある

40

【0013】

したがって、いくつかの態様において、本発明は、ウイルスを不活性化せずにHEV中に所望の配列を挿入するためのベクタープラットフォームを開発するためのcDNAクローンに関する。いくつかの態様において、本発明は、遺伝子型3のE型肝炎ウイルスの野生型株および細胞培養に適応したその子孫を提供する。いくつかの態様において、本発明は、本明細書において説明する遺伝子型3のE型肝炎ウイルスの野生型株の配列を含むベクターを提供する。いくつかの態様において、本発明は、本明細書において説明する複製可能な遺伝

50

子型3のE型肝炎ウイルスの感染性cDNAクローン、または本明細書において説明する複製可能な遺伝子型3のE型肝炎ウイルスに由来するキメラウイルスもしくは弱毒化ウイルス、ならびに例えばE型肝炎の人畜共通感染性伝播を研究するため、ならびにHEVワクチンおよび免疫原性組成物の開発のために使用され得る細胞培養システムを提供する。

【0014】

いくつかの態様において、本発明は、本明細書において説明する遺伝子型3のE型肝炎ウイルスに由来する配列を含むHEV用ワクチン、およびその弱毒化ウイルス派生物に関する。

【0015】

1つの局面において、本発明は、SEQ ID NO: 1に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、かつSEQ ID NO: 5のHEVヌクレオチド配列を参照して確認した場合にORF1中に挿入断片を含む、感染性E型肝炎ウイルス(HEV)cDNAクローンに関する。いくつかの態様において、HEV cDNAクローンは、SEQ ID NO: 1の核酸配列を含む。いくつかの態様において、HEV cDNAクローンは、20~100アミノ酸長のインフレームのアミノ酸配列をコードする挿入断片をORF1配列中に有する。いくつかの態様において、挿入断片は、30、35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60アミノ酸長のアミノ酸配列をコードする。いくつかの態様において、ORF1中の挿入断片は、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも50%の同一性、または少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、もしくは少なくとも85%の同一性を有する。いくつかの態様において、ORF1中の挿入断片は、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、もしくは少なくとも98%の同一性を有する。いくつかの態様において、挿入断片は、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、挿入断片は、HEVのORF1コード領域中のある位置に存在し、その際、挿入断片の最初のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 6に示すアミノ酸配列に関してアミノ酸750である。

【0016】

別の局面において、本発明は、ORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に挿入断片を含む、E型肝炎ウイルス(HEV)核酸配列を含む感染性cDNAクローンに関する。いくつかの態様において、HEV cDNAクローンは、20~100アミノ酸長のインフレームのアミノ酸配列をコードする挿入断片をORF1配列中に有する。いくつかの態様において、挿入断片は、30、35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60アミノ酸長のアミノ酸配列をコードする。いくつかの態様において、ORF1中の挿入断片は、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも50%の同一性、または少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、もしくは少なくとも85%の同一性を有する。いくつかの態様において、ORF1中の挿入断片は、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、もしくは少なくとも98%の同一性を有する。いくつかの態様において、挿入断片は、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、挿入断片はORF1の超可変領域中にあり、例えば、挿入断片は、挿入アミノ酸配列が、SEQ ID NO: 6を参照して確認した場合に750番目から始まるように、749番目のすぐ後に続く。いくつかの態様において、感染性cDNAクローンは遺伝子型3のHEVである。いくつかの態様において、cDNAクローンは遺伝子型1のHEVである。いくつかの態様において、感染性cDNAクローンは遺伝子型2または遺伝子型4のクローンである。

【0017】

さらなる局面において、本発明は、例えば、上記の2つの段落で説明したとおりの本発明の感染性cDNAクローンのいずれか1つのcDNAクローンのRNA転写物を含む細胞を含む、細胞培養システムに関する。

【0018】

さらなる局面において、本発明は、前述のcDNAクローンなどの本発明のcDNAクローンに由来するRNA転写物を細胞株、例えばヒト細胞株またはブタ細胞株中に導入する段階、お

10

20

30

40

50

よび、cDNAクローンによって産生されたウイルスを得る段階を含む、ワクチンを作製する方法に関する。

【0019】

さらなる局面において、本発明は、本明細書において説明する感染性HEVクローンによって産生されるウイルス、およびそのようなウイルスを含む薬学的組成物を提供する。

【0020】

1つの局面において、本発明は、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 8に示す配列を有するORF2をコードする、プロモーターに機能的に連結された異種核酸配列を含む発現カセットを宿主細胞中に導入する段階;およびORF2タンパク質を得る段階を含む、ワクチンを作製する方法に関する。

【0021】

さらなる局面において、本発明は、遺伝子型3のHEVの感染性cDNAクローンから得られたRNAを細胞株中に導入する段階であって、HEVクローンが、SEQ ID NO: 5に示すHEV核酸配列と比較して、ORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に少なくとも10アミノ酸長の挿入断片を含み、かつRNAがORF3を産生することができない、段階を含む、ワクチンを作製する方法に関する。いくつかの態様において、細胞株は、ブタ細胞株またはヒト細胞株である。

【0022】

本発明はさらに、慢性感染患者からウイルスを得る段階;培養中の細胞株に感染させて、例えば少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、またはそれ以上の回数に継代のために、該ウイルスを連続継代する段階;および細胞培養において複製する、慢性感染患者由来の変異体を選択する段階を含む、細胞培養において複製する能力を有するHEV株を得る方法に関する。

【0023】

いくつかの態様において、本発明は、複製するHEV cDNAクローンのRNA転写物から産生されたHEVウイルスを関心対象の製品のHEVウイルス状態を評価するための指標として使用する方法に関する。いくつかの態様において、このような方法は、公知の量の明細書において説明するHEVウイルスを解析しようとする材料、例えば、血液、水、食物に添加する段階;ウイルスを除去する工程、例えば、ろ過、加熱などにその材料を供する段階;およびウイルス除去工程後にその材料の試料中に存在する添加されたHEVウイルスの量を測定する段階を含む。残存しているHEVウイルスの量は、ウイルス除去工程の有効性を示している。

[本発明1001]

SEQ ID NO: 5に示すE型肝炎ウイルス(HEV)核酸配列に関して、ORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に挿入断片を含む、感染性HEV 3型cDNAクローンであって、該挿入断片が、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも85%の同一性を有するポリペプチド配列をコードする、感染性HEV 3型cDNAクローン。

[本発明1002]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9を含むポリペプチド配列をコードする、本発明1001記載の感染性HEV 3型cDNAクローン。

[本発明1003]

前記挿入断片によってコードされる最初のアミノ酸がSEQ ID NO: 6に関して750位に存在するように、該挿入断片がORF1の超可変領域中に配置される、本発明1001または本発明1002記載の感染性HEV 3型cDNAクローン。

[本発明1004]

SEQ ID NO: 1に対して少なくとも75%の配列同一性を有し、かつSEQ ID NO: 5に示すHEV核酸配列に関して、ORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に挿入断片を含む、感染性E型肝炎ウイルス(HEV)cDNAクローン。

[本発明1005]

SEQ ID NO: 1に対して少なくとも85%の同一性を有する、本発明1004記載のHEV cDNAク

10

20

30

40

50

ローン。

[本発明1006]

SEQ ID NO: 1に対して少なくとも95%の同一性を有する、本発明1005記載のHEV cDNAク

ローン。

[本発明1007]

SEQ ID NO: 1の核酸配列を含む、本発明1006記載のHEV cDNAクローン。

[本発明1008]

前記挿入断片が30～100アミノ酸長のインフレームのアミノ酸配列をコードする、本発明1004～本発明1006のいずれか一項記載のHEV cDNAクローン。

[本発明1009]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、本発明1008記載のHEV cDNAクローン。

[本発明1010]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、本発明1009記載のHEV cDNAクローン。

[本発明1011]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、本発明1010記載のHEV cDNAクローン。

[本発明1012]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列をコードする、本発明1011記載のHEV cDNAクローン。

[本発明1013]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 10の下線を引いた部分に対して少なくとも90%の核酸配列同一性を有する、本発明1004～本発明1006のいずれか一項記載のHEV cDNAクローン。

[本発明1014]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 10の下線を引いた部分を含む、本発明1013記載のHEV cDNAクローン。

[本発明1015]

ORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に挿入断片を含み、かつ該挿入断片が、少なくとも10アミノ酸長のアミノ酸配列をコードする、E型肝炎ウイルス(HEV)核酸配列を含む感染性cDNAクローン。

[本発明1016]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するインフレームのポリペプチド配列をコードする、本発明1015記載のcDNAクローン。

[本発明1017]

前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するインフレームのポリペプチド配列をコードする、本発明1016記載のcDNAクローン。

[本発明1018]

前記ポリペプチド配列がSEQ ID NO: 9を含む、本発明1017記載のcDNAクローン。

[本発明1019]

遺伝子型3のHEVである、本発明1015～本発明1018のいずれか一項記載のcDNAクローン。

[本発明1020]

遺伝子型1のHEVである、本発明1015～本発明1018のいずれか一項記載のcDNAクローン。

[本発明1021]

本発明1001～本発明1020のいずれか一項記載のcDNAクローンを含む細胞を含む、細胞培養システム。

[本発明1022]

本発明1001～本発明1020のいずれか一項記載のcDNAクローンから得られたRNAを細胞中に導入する段階、および、該RNAによって産生されたウイルスを得る段階を含む、ワクチンを作製する方法。

10

20

30

40

50

[本発明1023]前記RNAをウイルス粒子として前記細胞中に導入する、本発明1022記載の方法。[本発明1024]前記細胞がMRC5肺細胞である、本発明1022または本発明1023記載の方法。[本発明1025]以下の段階を含む、ワクチンを作製する方法：遺伝子型3のHEVのcDNAクローンから得られたRNAを細胞株中に導入する段階であって、該HEVクローンが、SEQ ID NO: 5に示すHEV核酸配列と比較して、ORF1の超可変領域をコードする核酸配列の領域中に少なくとも10アミノ酸長のアミノ酸配列をコードする挿入断片を含み、かつ該RNAがORF3を産生することができない、段階；および
該RNAによって産生されたウイルスを得る段階。

10

[本発明1026]前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するインフレームのポリペプチド配列をコードする、本発明1025記載の方法。[本発明1027]前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するインフレームのポリペプチド配列をコードする、本発明1026記載のcDNAクローン。[本発明1028]前記挿入断片が、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド配列をコードする、本発明1027記載のcDNAクローン。

20

[本発明1029]前記挿入断片によってコードされる最初のアミノ酸がSEQ ID NO: 6に関して750位に存在するように、該挿入断片がORF1の超可変領域中に配置される、本発明1025～本発明1028のいずれか一項記載の方法。[本発明1030]以下の段階を含む、ウイルス処理工程に供された関心対象の製品のウイルス状態を評価する方法：本発明1001～本発明1020のいずれか一項記載のcDNAクローンを用いて産生させたHEVウイルスを、該製品に添加する段階；該製品を、該製品中に存在するウイルスを除去および/または不活性化するウイルス処理工程に供する段階；ならびに 該ウイルス処理工程の後または最中に残存している添加されたウイルスの該製品中のレベルを測定する段階。

30

[本発明1031]前記関心対象の製品が、水、血液、または、動物が摂取するための食物である、本発明1030記載の方法。[本発明1032]前記食物が、ヒトが摂取するためのものである、本発明1031記載の方法。【図面の簡単な説明】【0024】【図1】ヒト肝癌細胞中の増殖に対するKernow-C1ウイルスの適応。糞便中に存在するウイルス(四角)またはHepG2/C3A細胞において6回連続継代したウイルス(丸)のほぼ同量をHepG2/C3A細胞に低MOIで接種し、培地中に放出された感染性ウイルス(パネルA)およびウイルス総量(パネルB)を、それぞれHepG2/C3A細胞におけるフォーカス形成アッセイ法およびRT-PCRによって定量した。回収した試料すべておよび貯蔵された接種材料のフォーカスアッセイ法を、三通りでかつ記号化して、同時に実施した。直接比較により、産生したウイルスがずっと少なかった糞便接種材料が、実は、継代された接種材料よりも感染性ウイルスを5倍多く含んでいたことが示された。FFUおよびRNAに関するスケールの違いに留意されたい。エラーバーは標準偏差である。

40

【図2】ヒト細胞およびブタ細胞におけるE型肝炎ウイルスの比較力価測定。各ウイルスの段階希釈物を、8ウェルのチャンバースライドに入れたヒトHepG2/C3A細胞(中を塗りつ

50

ぶしたバー)またはLLC-PK1ブタ細胞(白抜きのバー)に三通り接種した。3日後に、スライドを記号化し、ORF2タンパク質について免疫染色し、終点におけるフォーカスを手作業で数えた。全試料を計数するまで、記号は明らかにしなかった。スチューデントのt検定のp値は、0.006~0.016の範囲に及んだ。

【図3】シカ細胞におけるORF2の差次的翻訳。(A)シカ細胞を、表示した株に感染させ、3日後に免疫染色し、ORF2タンパク質(中を塗りつぶしたバー)、ORF3タンパク質(白抜きのバー)、および両方のタンパク質(斜線をひいたバー)を含む細胞すべてを数えた。(B)Sar-55配列(CMV-Sar)、Kernow-C1配列(CMV-Kernow)、または最初の29個のヌクレオチドをKernow-C1のヌクレオチドで置換したSar-55配列(CMV-MT29)を含むサイシストロン性mRNAを発現するCMVプラスミドでシカ細胞およびS10-3ヒト細胞をトランスフェクトした。2日後、ORF2タンパク質またはORF3タンパク質について免疫染色された細胞をFACSによって定量し、染色された細胞の比率(%)に基づいて、ORF2に対するORF3の比率を算出した(バーの上に表示している)。

【図4】Kernow-C1の超可変領域中へのヒト配列の挿入。ヒトリボソーム遺伝子S17配列とHepG2/C3A細胞において6回継代したウイルスから増幅させたRT-PCR産物の直接的配列決定によって得られた配列とのアライメント。挿入断片に隣接するHEV配列に下線を引いている。(A)ヌクレオチド:HEV(SEQ ID NO: 11)、S17(SEQ ID NO: 12);(B)アミノ酸HEV(SEQ ID NO: 13)、S17(SEQ ID NO: 14)。

【図5】順次的なプラスミド構築物を用いたS10-3細胞のトランスフェクション。注目した制限断片を、6回継代ウイルス疑似種から増幅させた対応する断片で置換した。新規構築物は次の置換のためのバックグラウンドとしての機能を果たし、p1のすべてがp6配列で置換されるまでこの手順を繰り返した。同じ実験において、すべてのプラスミドを転写し、トランスフェクトし、ORF2タンパク質について免疫染色した。三通りの試料を回収し、トランスフェクション後3日目にフローサイトメトリーによって試験した。隣接した試料にスチューデントのt検定のP値を与える。P=0.05を有意とみなした。エラーバーは標準偏差を示す。

【図6】X領域中のアミノ酸882,904および965を復帰させると、トランスフェクションのレベルが低下する。S10-3細胞に、CCA変異およびX領域変異を欠く5'ORF1プラスミド、CCA変異およびX領域変異の両方を含むORF1/CCAプラスミド、p6、ならびにCCA変異を含むがX領域変異を組まない復帰変異プラスミドをトランスフェクトした。三通りの試料中の細胞を免疫染色し、トランスフェクション後6日目にフローサイトメトリーによって解析した。P値が与えられ、エラーバーは標準偏差を示す。

【図7】p6からS17配列を除去すると、大半の点変異の適応効果がなくなる。S17配列を含むまたは含まないp1プラスミドおよびp6プラスミドをS10-3細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後4日目に、三通りの試料をフローサイトメトリーによって解析した。p6delS17に対するp1/S17を除いて、P値はすべて0.0001より小さかった。エラーバーは標準偏差を示す。

【図8】ORF2からのルシフェラーゼの発現は、S17挿入断片の存在下ではかなりあり、延長される。S17挿入断片またはX遺伝子領域変異のないp6ゲノムにおいて、ORF2ウイルスカプシドタンパク質をガウシアルルシフェラーゼレポーター遺伝子で置換した。S10-3細胞のトランスフェクション後、24時間毎に培地を完全に交換した。パネルA。S17挿入断片を含む(中を塗りつぶしたバー)または含まない(斜線を引いたバー)ゲノムによって産生されたルシフェラーゼ単位の比を、各時点の上の括弧内に示している。エラーバーは標準偏差である。パネルB。3つのX遺伝子変異のない独立したcDNAクローン2つによってコードされるゲノムからの平均ルシフェラーゼ産生(斑点を付けたバーおよび網がけにしたバー)は、p6/lucゲノム(中を塗りつぶしたバー)からのルシフェラーゼ産生と比べて減少し、2.3分の1~5.1分の1となった。各時点の上の括弧内に比を示している。

【図9】S17挿入断片中の同義変異は、トランスフェクション効率にほとんど影響を与えない。アミノ配列を保存する変異をS17挿入断片中の54/58コドン(変異体1番)または41/58コドン(変異体2番)の3番目の塩基に導入し、RNA転写物をS10-3細胞中にトランスフェクト

10

20

30

40

50

した。トランスフェクション後5日目に、フローサイトメトリーによって三通りの試料のトランスフェクション効率を測定した。

【図10】異なるHVRをコードするp6ゲノム転写物によるトランスフェクション効率の比較。トランスフェクション後5日目または6日目に、三通りの試料をフローサイトメトリーにかけた。エラーバーは標準偏差を表し、角括弧はスチューデントのt検定のP値を示す。アミノ酸58個のS17挿入断片をコードする174ntを欠失させるか、次のもので置換した。A: 1回継代物に由来する114ntのGTPアーゼ挿入断片または緑色蛍光タンパク質(GFP)の3'末端の174nt。1番および2番は、2つの独立したクローンである。p6対他の任意のゲノムのP値 = 0.0003。B: GFPの最初の58個のアミノ酸をコードする5'の174nt。1番~3番は、3つの独立したクローンである。p6対他の任意のゲノムのP値 = <0.001。C: S17挿入断片の5'、中央、または3'の半分の87nt。p6対他の任意のゲノムのP値 0.0002。D: 117ntのS19リボソームタンパク質遺伝子挿入断片。1番および2番は、2つの独立したクローンである。p6対他の任意のゲノムのP値 <0.001、3つのGFPクローン間のP値 = >0.27。

10

【図11】p6によってコードされるゲノムまたはウイルスは、ブタLLC-PK1細胞において複製することができ、ブタLLC-PK1細胞に感染することができる。A: S17挿入断片のないp6に由来するかまたはS17挿入断片を含むp6に由来する転写物をトランスフェクトされたブタ細胞を、トランスフェクション後5日目にフローサイトメトリーによって分析した。B: トランスフェクトされたHepG2/C3A細胞の培地から回収したp6ウイルスの三通りの試料を、記号化してHepG2/C3A細胞(白抜きのバー)およびLLP-CK1細胞(斑点を付けたバー)において並行して力価測定した。

20

【図12】S10-3細胞およびBHK-21細胞のSar55トランスフェクションに対するS17挿入断片の影響。S10-3(A)細胞およびBHK-21(B)細胞のトランスフェクション効率をフローサイトメトリーによってモニターした。

【図13】ORF3タンパク質の欠如によってHepG2/C3A培養物における細胞間伝播は阻害されない。HepG2/C3A細胞にp6プラスミドまたはp6/ORF3ヌルプラスミドに由来する転写物をエレクトロポレーションし、未処理のHepG2/C3A細胞と混合し37℃で培養した。4日間の各日に三通りの試料を回収し、メタノールで固定し、フローサイトメトリーによって分析するまで-80℃で保存した。エラーバーは標準偏差である。2種のウイルスの5日目の値に関してP=0.74であったことから、同様の数の細胞が各構築物でトランスフェクトされていたことが示された。

30

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明
定義

本明細書において使用される「E型肝炎ウイルス」(「HEV」)という用語は、ウイルス、ウイルスのタイプ、又はウイルスのクラスを意味する。HEVは、ヘペウイルス(Hepevirus)属に分類され、ゲノムサイズが7.2kbであり、3つのオープンリーディングフレーム(ORF)ならびに5'および3'のシス作用エレメントを有する、プラスセンス一本鎖RNA正二十面体ウイルスである。ORF1は、メチルトランスフェラーゼ、プロテアーゼ、ヘリカーゼ、およびレプリカーゼをコードし、ORF2はカプシドタンパク質をコードし、ORF3は、機能が未確定のタンパク質をコードする。1つの公知の血清型を有する4つの主要な遺伝子型が存在する。

40

【0026】

本発明において、HEVウイルス「慢性感染」患者は、少なくとも6ヶ月間感染している。例えば、患者中のHEV配列のレベルを測定することによって、典型的には、血清試料中または糞便試料中のウイルスRNAのレベルを測定することによって、感染期間を測定することができる。

【0027】

本明細書において使用される場合、本発明のHEV変種に関する「感染性」とは、HEVが培養中に複製する能力を意味する。本発明において、cDNAクローンは、細胞に感染し細胞中

50

で複製することができるウイルスRNAゲノムをコードするため、「感染性クローン」または「複製するcDNAクローン」であるとみなされる。典型的な態様において、ウイルスRNAゲノムは、ファージポリメラーゼを用いてインビトロでcDNAクローンから合成され、次いで、そのRNAが細胞中に導入される。本発明において、「感染性」とは、細胞株中で複製する能力も意味する。例えば、細胞株、例えば、HepG2肝癌細胞株またはLLC-PK1腎臓ブタ細胞株などのヒトまたはブタの肝臓細胞株または腎臓細胞株にトランスフェクトする場合、複製能力を与える挿入断片を含むように改変されてはいない遺伝子型を用いて得られる数と比較して、より多数のトランスフェクタント、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも75%、もしくは少なくとも100%、またはそれ以上の数のトランスフェクタントを得ることである。典型的な態様において、ORF2のレベルを評価して、より多数のトランスフェクタントを測定する。いくつかの態様において、感染性ウイルスの数(ピーク時のウイルス産生)を評価して、本発明のHEV変種の複製能力を測定する。周知のアッセイ法、例えば、フォーカスアッセイ法を、感染性ウイルスの数の測定法として使用することができる。本明細書において使用される場合、「複製する」HEV株とは「感染性」HEV株であり、「感染性」HEV株は、「複製する」HEV株であると理解される。ORF2産生を測定するための方法論は、当技術分野において周知である。例えば、フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡検査を使用することができる。当技術分野において理解されているとおり、本発明の変種が培養中に複製する能力を評価する際に肝臓細胞および腎臓細胞がしばしば使用され得るが、他の細胞、例えば、MRC5肺細胞もまた、使用され得る。

【0028】

「組換え」という用語は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、もしくはベクターに関して使用される場合、その細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種の核酸もしくはタンパク質の導入、または天然の核酸もしくはタンパク質の変更によって改変されていること、またはその細胞がそのように改変された細胞に由来していることを示す。したがって、例えば、組換え細胞は、その細胞の天然(非組換え)型の内部には存在しない遺伝子を発現するか、またはさもなければ異常に発現されるか、過小発現されるか、もしくは全く発現されない天然遺伝子を発現する。本明細書における「組換え核酸」という用語は、一般に、核酸操作によって、例えば、ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いてインビトロで最初から形成させた、天然には通常見出されない形態の核酸を意味する。この様式で、様々な配列の機能的連結が実現される。したがって、直線型の単離された核酸、または通常は連結されていないDNA分子を連結することによってインビトロで形成させた発現ベクターは、どちらも、本発明の目的のための組換え体とみなされる。一度、組換え核酸が作製され、宿主細胞または宿主生物中に再導入されると、これは、組換えによらずに、すなわち、インビトロ操作ではなく、宿主細胞のインビボの細胞機構を用いて複製することが理解される。しかしながら、このような核酸は、組換えによって作製された後、続いて組換えによらずに複製されるが、それでもなお、本発明の目的のための組換え体とみなされる。同様に、「組換えタンパク質」は、組換え技術を用いて、すなわち、前述の組換え核酸の発現によって作製されるタンパク質である。

【0029】

あるタンパク質またはペプチドに言及する場合、抗体に「特異的に(もしくは選択的に)結合する」または「特異的に(もしくは選択的に)免疫反応性である」という語句は、抗体が関心対象のタンパク質に結合する結合反応を意味する。本発明において、典型的には、抗体は、本発明のHEVポリペプチドなどの抗原に、他の抗原に対する親和性より少なくとも10倍優れた親和性で結合する。

【0030】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書において同義的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを意味する。これらの用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマー、修飾残基を含むもの、お

10

20

30

40

50

よび天然に存在しないアミノ酸ポリマーにも適用される。

【0031】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を意味する。天然に存在するアミノ酸とは、遺伝コードによってコードされるもの、ならびに後で修飾されるそれらのアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造、例えば、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合されている炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを意味する。このような類似体は、修飾されたR基を有してよく(例えばノルロイシン)、または修飾されたペプチド骨格を有してよいが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持している。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する、化学的化合物を意味する。

10

【0032】

アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB生化学命名法委員会(Biochemical Nomenclature Commission)により推奨される、一般に公知の3文字記号または1文字記号のいずれかによって呼ぶことができる。同様に、ヌクレオチドも、一般に認められている1文字記号によって言及することができる。

【0033】

「保存的置換」という用語は、分子の活性(特異性または結合親和性)を実質的に変更しないアミノ酸置換を示すために、タンパク質またはペプチドに関して使用される。典型的には、保存的アミノ酸置換は、1つのアミノ酸を同様の化学的特性(例えば、荷電または疎水性)を有する別のアミノ酸に置換することを含む。以下の6つのグループは、互いに典型的な保存的置換であるアミノ酸をそれぞれ含む：

20

- (1)アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T)；
- (2)アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；
- (3)アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；
- (4)アルギニン(R)、リジン(K)；
- (5)イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；および
- (6)フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)。

30

【0034】

「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそのポリマーを意味する。具体的に限定しない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し天然ヌクレオチドと同様の様式で代謝される、天然に存在するヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。別段の定めが無い限り、個々の核酸配列は、保存的に改変されたその変種(例えば縮重コドン置換体)および相補的配列ならびに明瞭に示された配列も暗黙的に包含する。

【0035】

「単離された」または「実質的に精製された」という用語は、他の細胞構成要素が本質的に取り除かれた化学的組成物を意味する。このような組成物は、均質な状態で存在することができるが、乾燥状態または水溶液中のいずれかで存在することができる。純度および均質性は、典型的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動もしくは高速液体クロマトグラフィーまたは質量分析法などの分析化学技術を用いて測定される。調製物中に存在する主な化学種であるタンパク質は、実質的に精製されている。一般に、実質的に精製されたまたは単離されたタンパク質は、調製物中に存在するあらゆる高分子種の80%超を構成すると考えられる。いくつかの態様において、タンパク質は、存在するあらゆる高分子種の90%超、95%超を占めるようになるまで精製されるか、または他の高分子種が従来の技術によって検出されない本質的に均質な状態まで精製される。

40

【0036】

50

2つまたはそれ以上の核酸またはポリペプチド配列という文脈における、「同一の」または「同一性」パーセントという用語は、後述の配列比較アルゴリズムの内の1つを用いて、または手動アライメントおよび目視検査によって測定して、比較ウィンドウまたは指定された領域の全体に渡って最大限一致するように比較およびアラインさせた場合に、同じであるか、または特定の比率の同じヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する(例えば、指定の領域の全体に渡って少なくとも60%の同一性、任意で、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、もしくは少なくとも99%の同一性)、2つまたはそれ以上の配列または部分配列を意味する。あるいは、同一性パーセントは、60%~100%の任意の整数でもよい。これらの定義は、核酸配列の相補体にも当てはまる。

10

【0037】

「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウの全体に渡って最適にアラインされた2つの配列を比較することによって決定され、その際、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の比較ウィンドウ内の部分は、それら2つの配列の最適アラインメントのための参照配列(付加も欠失も含まない)と比べて付加または欠失(すなわちギャップ)を含む場合がある。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両配列中に存在する位置の数を測定して、一致した位置の数を明らかにし、この一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性パーセンテージを明らかにすることにより計算される。

【0038】

20

「比較ウィンドウ」とは、本明細書において使用される場合、隣接位置の数のいずれか1つを有するセグメントへの言及を含み、このセグメントにおいて、ある配列を同数の隣接位置の参照配列と、それら2つの配列を最適にアラインした後に比較することができる。比較のために配列をアラインする方法は、当技術分野において周知である。

【0039】

配列同一性および配列類似性のパーセントを決定するのに適しているアルゴリズムの例は、Altschul et al. (Nuc. Acids Res. 25:3389-402, 1977)およびAltschul et al. (J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990)においてそれぞれ説明されているBLAST アルゴリズムおよびBLAST 2.0 アルゴリズムである。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)から公的に利用可能である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインさせた場合に、何らかの正の値の閾値スコアTに合致するかまたはそれを満たす、クエリ配列中の長さWの短いワードを特定することによって、高スコア配列ペア(HSP)を最初に特定する段階を含む。Tは、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる(Altschul et al., 前記)。これら初期の近隣ワードのヒットは、それらを含むより長いHSPを発見するための検索を開始するためのシードの役割を果たす。これらのワードヒットを、累積アライメントスコアが増加し得る限り、各配列に沿って両方向に伸長させる。累積スコアは、ヌクレオチド配列の場合、パラメーターM(1対の一致残基に対するリワード(reward)スコア、常に0より大きい)およびパラメーターN(不一致残基に対するペナルティスコア、常に0未満)を用いて、算出する。アミノ酸配列の場合は、スコアリングマトリックスを用いて、累積スコアを算出する。各方向へのワードヒットの伸長は以下の場合に停止される:累積アライメントスコアが、その最大達成値から量Xだけ減少する場合;累積スコアが、1つもしくは複数の負スコアの残基アライメントの蓄積が原因で、0もしくはそれ以下になる場合;または、いずれかの配列の末端に達した場合。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アライメントの感度および速度を決定する。(ヌクレオチド配列用の)BLASTNプログラムは、初期設定として、ワード長(W)11、期待値(E)10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、初期設定として、ワード長3、および期待値(E)10、ならびにBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989を参照されたい)、アライメント(B)50、期待値(E)10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する

30

40

50

。本出願のために、典型的には、初期設定パラメーターに設定されたBLAST2アルゴリズムを用いて同一性パーセントを決定する。

【0040】

所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列の位置決めという文脈において使用される場合、「に対応する」、「を参照して」、「と比較して」、または「に関して」とは、所与のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列が参照配列と比較された場合の、関心対象の指定された配列の残基の位置決めを意味する。例えば、HEV ORF1コード配列の超可変領域中の挿入断片の位置決めに関する場合、関心対象の配列は、HEV ORF1参照配列とアラインされ、参照配列と比較されて、ORF1超可変領域中の挿入位置が決定される。

【0041】

「1つの(a)」または「1つの(an)」という用語は、別段の定めが無い限り、「1つまたは複数の」を意味すると通常は意図される。

【0042】

序論

本発明は、細胞培養中の様々な細胞型において複製する能力を与える、遺伝子型3のHEV株における配列変異の発見に基づいている。したがって、本発明は、HEV遺伝子型3タンパク質または生物学的機能を有するHEV遺伝子型3タンパク質断片をコードする核酸配列、診断用試薬および治療用試薬、ならびに例えばワクチンを調製するための、本明細書において説明するHEVクローンを使用する方法を提供する。

【0043】

1つの局面において、本発明は、E型肝炎ウイルス 遺伝子型3のKernow株の複製する変種の完全長ヌクレオチド配列をコードする核酸、具体的にはcDNA、およびその変種に関する。

【0044】

さらなる局面において、本発明は、ORF1、例えばORF1の超可変領域をコードするE型肝炎ウイルス核酸配列の領域中に、ある核酸配列をインフレームで挿入することによってE型肝炎ウイルス株を改変して、その株が細胞培養において複製する能力を増大させることに関する。

【0045】

本発明は、関心対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを合成することおよびそれらのポリヌクレオチドを発現システムで発現させることに関する、組換え遺伝学の分野の慣用技術を使用する。通常、後述する組換えDNA技術の学術用語および実験手順は、当技術分野において周知であり一般に使用されるものである。本発明において使用する一般的方法を開示している基本的な教科書には、Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd Ed, 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); ならびに *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994-2009および最新版, Wiley Interscience)が含まれる。

【0046】

複製するHEV株

本発明は、細胞培養において複製することができるHEV cDNAに関する。1つの態様において、細胞培養において複製する能力を有する本発明のHEV cDNAは、SEQ ID NO: 1に示すヌクレオチド配列を有するcDNAクローンに対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の同一性、またはそれを上回る同一性を有する。いくつかの態様において、本発明のHEV cDNAは、SEQ ID NO: 2に示すORF1配列に対して、少なくとも85%、典型的には少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の同一性、またはそれを上回る同一性を有するHEV ORF1をコードする。いくつかの態様において、複製する能力を有する本発明による完全長クローンは、SEQ ID NO: 1に示すヌクレオチド配列を有するcDNAクローンに対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少な

10

20

30

40

50

くとも95%、または少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の同一性、またはそれを上回る同一性を有し、かつSEQ ID NO: 6に関して、SEQ ID NO: 6において下線を引いて示しているORF1の超可変領域中に、挿入物を含む。いくつかの態様において、挿入物は、SEQ ID NO: 6を参照して確認した場合にアミノ酸 750から始まる。いくつかの態様において、挿入物は、長さが約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、もしくは約200アミノ酸長、またはそれ以上の長さのアミノ酸配列をコードする。いくつかの態様において、挿入断片のアミノ酸配列は、50~65アミノ酸長である。いくつかの態様において、挿入断片のアミノ酸配列は、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、または70アミノ酸長である。いくつかの態様において、挿入断片のアミノ酸配列は、少なくとも40、45、50、または55アミノ酸長である。いくつかの態様において、挿入断片は、58アミノ酸長である。いくつかの態様において、挿入断片は、SEQ ID NO: 9に示す配列を有する。いくつかの態様において、ORF1中の挿入断片をコードするヌクレオチド挿入物のサイズは、約60ヌクレオチド長~約300ヌクレオチド長である。

10

【0047】

いくつかの態様において、本発明の複製するHEVクローンは、SEQ ID NO: 5に関して、ORF2をコードする領域中に変異を有する。いくつかの態様において、本発明の複製するHEVクローンは、SEQ ID NO: 5に示すヌクレオチド配列に関して、ORF1の超可変領域をコードする領域中に挿入断片を有し、かつSEQ ID NO: 5に関して、ORF2をコードする領域中にさらなる変異を有する。

20

【0048】

さらなる態様において、本発明の複製するクローンは、SEQ ID NO: 6に関してORF1中の13個のアミノ酸位置および/またはSEQ ID NO: 8に関してORF2中の2個のアミノ酸位置をコードする1つまたは複数のヌクレオチド変化を有する。いくつかの態様において、複製するクローンは、本明細書において説明する挿入物、および元のウイルスに関してp6 Kernowウイルスにおいて変異している表4に示す位置より選択されるアミノ酸位置をコードする1つまたは複数のさらなる変異を有する。

【0049】

いくつかの態様において、本発明の複製するHEV cDNAは、ORF1中に、典型的にはORF1の超可変領域中に挿入断片を含む。複製するHEV cDNAは、任意の遺伝子型のものでよい。いくつかの態様において、HEV遺伝子型1株は、ORF1中に挿入断片を含む。いくつかの態様において、HEV遺伝子型3株は、ORF1中に挿入断片を含む。いくつかの態様において、HEV遺伝子型2株またはHEV遺伝子型4株は、ORF1中に挿入断片を含む。挿入断片を含む本発明によるHEV cDNAは、挿入断片を含まないcDNAと比較して、細胞培養において複製する能力が増大している。いくつかの態様において、挿入断片は、ORF1の超可変領域中にある。いくつかの態様において、挿入アミノ酸配列が、SEQ ID NO: 6を参照して確認した場合にORF1タンパク質配列の750番目から始まるように、挿入物は749番目の後に続く。いくつかの態様において、挿入断片は、リボソームRNAタンパク質の配列をコードする。例えば、挿入断片は、SEQ ID NO: 9に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、もしくは95%、またはそれ以上の同一性を有する。

30

40

【0050】

いくつかの態様において、ORF1中の挿入断片は、SEQ ID NO: 10に示す配列の下線を引いた部分によってコードされる。

【0051】

複製するHEV cDNAは、当技術分野において周知の技術を用いて構築することができる。例えば、完全長cDNAクローンは、RT-PCRによって作製したcDNA断片から組み立てることができる。次いで、このようなcDNAクローンを転写して、細胞中にトランスフェクトするためのRNAを得ることができる。

【0052】

50

上記のとおり、本発明は、培養中の様々な細胞株において複製する能力を保持している、例として提供される参照cDNA配列、例えばSEQ ID NO: 1の変種を包含する。さらに、当技術分野において理解されるとおり、遺伝コードの縮重のために、HEVオープンリーディングフレームの産生を指示できるDNA配列を提供すると考えられるヌクレオチドを数多く選択できることが理解される。

【0053】

本発明のHEVcDNAによってコードされるポリペプチド

さらなる局面において、本発明は、本発明の複製するHEV cDNAクローンによってコードされるポリペプチドおよび本発明の複製するHEV cDNAクローンを用いてそのようなポリペプチドを作製する方法を提供する。いくつかの態様において、このようなポリペプチドは、本発明の核酸配列をトランスフェクトされた細胞によって産生されるE型肝炎ウイルスから完全にまたは部分的に精製され得る。別の態様において、1つまたは複数のポリペプチドは、本発明の核酸配列の断片から組換えによって作製される。さらに別の態様において、ポリペプチドは、化学的に合成される。本発明のポリペプチド、特に、構造ポリペプチドは、ワクチンを開発する際の免疫原として、または生物試料中のHEVの存在を検出するための診断アッセイ法を作り出す際の抗原として、役立つことができる。

【0054】

いくつかの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 2もしくはSEQ ID NO: 6に示すORF1アミノ酸配列;SEQ ID NO: 4もしくはSEQ ID NO: 8に示すORF2アミノ酸配列;またはSEQ ID NO: 3もしくはSEQ ID NO: 7に示すORF3アミノ酸配列を有するポリペプチドもしくは断片;またはその断片もしくは変種を提供する。いくつかの態様において、本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 8のORF2タンパク質に対して、少なくとも90%、95%、もしくは100%、またはそれ以上の配列を有する。いくつかの態様において、本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 8のORF2タンパク質の断片に対して、少なくとも95%、典型的には少なくとも96%、97%、98%、もしくは99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性である配列を有し、その際、この断片は、少なくとも少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、または少なくとも600アミノ酸長である。いくつかの態様において、本発明のポリペプチドは、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 6のORF1タンパク質の断片に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、典型的には少なくとも96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列を有し、その際、この断片は、100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも700、少なくとも1000、または少なくとも1500アミノ酸長である。いくつかの態様において、本発明は、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 3、またはSEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【0055】

本発明のポリペプチドは、例えば、診断目的および予後目的のために使用され得る。例えば、いくつかの態様において、本発明のポリペプチドは、抗体の産生を刺激するための免疫原として使用され得る。

【0056】

ベクターおよび宿主細胞

本発明の複製するウイルスは、任意の数の宿主細胞中で培養され得る。例えば、いくつかの態様において、RNAが、本発明の複製するcDNAクローンから獲得され、細胞株、例えば、ヒト、ブタ、またはげっ歯動物の肝臓細胞株中に導入される。いくつかの態様において、細胞株は、肝臓細胞株または腎臓細胞株でよいが、他の細胞株、例えば肺細胞株もまた、使用され得る。いくつかの態様において、複製するcDNAクローンは、初代細胞培養物、例えば、肝細胞の初代培養物中に導入され得る。次いで、RNAは感染性ウイルスを産生する。いくつかの態様において、初代肝細胞を培養し、次いでHEVに感染させることができ、または肝細胞培養物は感染動物の肝臓に由来してもよい。さらに、当業者に公知の様々な不活化方法を用いて、肝細胞培養物に由来する細胞株を得ることができる。例えば、初代肝細胞培養物は、安定性を維持するために様々な細胞と融合されてよい。

【 0 0 5 7 】

本発明のcDNAクローンの感染力は、様々なアッセイ法を用いて評価することができる。例えば、いくつかの態様において、一旦、cDNAクローンから得られたRNAを細胞中に導入すると、タンパク質、例えば、ORF2の発現を評価することができる。代替の態様において、cDNAの最初のRNAコピーの導入によって開始されるウイルス複製の間に産生されるRNA転写物を評価することができる。

【 0 0 5 8 】

典型的な態様において、本発明のHEVクローンの複製能力は、HEVクローンを用いて得られるトランスフェクタントの数を測定すること(すなわち、cDNAクローンのRNAコピーを用いて得ること)によって評価される。複製するcDNAクローンとみなされる、ORF1中に挿入断片を有する本発明の変種cDNAクローンは、ある細胞株、例えばHepG2、または他の細胞株において検査した場合に、挿入断片を欠く同じcDNAクローンの変型と比べて、少なくとも10%多い、典型的には、少なくとも20%多い、または少なくとも30%、40%、50%、80%、もしくは100%、またはそれ以上の数のORF2発現トランスフェクタントを有する。本発明において、典型的には、「複製する」cDNAクローンは、細胞株中に直接導入されないが、インビトロ転写のために使用される。転写から得られたRNAは、細胞株中に導入される。当業者は、ORF2レベルの測定の代わりとなるエンドポイント、例えばピーク時のウイルス粒子の産生を測定してもよいことを理解する。

【 0 0 5 9 】

1つの態様において、ヒト細胞をインビトロで増殖させて、本発明の核酸をトランスフェクトすることができる。次いで、ヒト細胞を評価して、細胞がHEV感染の任意の徴候を示すかどうか判定することができる。このような徴候には、例えば、当技術分野において一般に公知の免疫蛍光法手順によって細胞中のウイルス抗原を検出すること;ウェスタンブロット法によってウイルスポリペプチドを検出すること;およびRT-PCRなどの方法によって、新しく転写された細胞内ウイルスRNAを検出することが含まれる。細胞培養培地または細胞溶解物を健全な感受性の動物に注射し、HEV感染の症状がその後提示されることによって、このような試験の後に生きた感染性ウイルス粒子が存在することを示すこともできる。

【 0 0 6 0 】

いくつかの態様において、本発明の感染性核酸をブタなどの宿主動物中に導入して、例えば、HEVクローンのビルレンスを評価することができる。感染性核酸配列のトランスフェクションによって作製されたウイルスのビルレンス表現型は、当技術分野において公知の方法によって、例えば、肝臓酵素レベル(アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)もしくはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(ICD))の測定によって、または肝臓生検材料の病理組織診断によって、評価することができる。

【 0 0 6 1 】

1つの態様において、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞中で発現させるための発現カセット中に組み込まれ得る。発現システムは当技術分野において周知であり、例えば、大腸菌(E.coli)などの細菌、酵母、昆虫細胞、または哺乳動物細胞が含まれる。発現ベクターには、ウイルスベースのベクターならびにプラスミドベクターが含まれる。いくつかの態様において、HEVポリペプチドおよびHEVペプチドは、ヒト宿主細胞において発現される。

【 0 0 6 2 】

さらなる態様において、本発明はまた、異なる株に由来するHEV配列からなる「キメラ核酸配列」にも関する。したがって、1つの態様において、キメラ核酸配列は、本発明の感染性クローンに由来する配列、例えば、本明細書において説明する複製するcDNAクローンに由来するORF1をコードするポリヌクレオチド、および別のHEV株に由来する配列、例えば、ORF2をコードするポリヌクレオチドを有し得る。このようなキメラ配列は、標準的技術によって作製することができる。

【 0 0 6 3 】

いくつかの態様において、遺伝子の全体もしくは一部分または感染性核酸配列に含まれる5'もしくは3'非翻訳領域の全体もしくは一部分は欠失していてもよい。次いで、このような配列は、変異配列と共に宿主細胞(動物または細胞培養物)中にトランスフェクトされ得る。ウイルスの複製は、RT-PCRなどの公知の方法を用いて測定することができる。いくつかの態様において、例えば、HEVポリタンパク質のタンパク質間に存在し、ポリタンパク質の適切なプロセッシングに参与している切断部位境界を保存するために、HEV遺伝子の中央部分の欠失が作られる。

【0064】

いくつかの態様において、本発明の核酸配列は、細胞培養システム、例えば、哺乳動物細胞培養システムにおいて発現させるために最適化されたコドンを含むように設計される。例えば、個々のコドンが宿主によって使用される頻度に従って、個々の原核生物宿主または真核生物宿主においてペプチド/ポリペプチドの発現が起こる速度を上昇させるように、コドンが選択され得る。いくつかの態様において、より長い半減期などの所望の特性を有するRNA転写物を産生するように、コドンが選択される。

【0065】

1つの態様において、本発明の核酸配列をトランスフェクトされた動物細胞(例えばヒト細胞)はインビトロで培養され、これらの細胞は、抗ウイルス活性に関する候補の抗ウイルス物質(化学物質、ペプチドなど)を培地に添加することにより、候補物質で処理される。次いで、感染が起こるのに十分な期間が経過させられ、その後、当業者に公知の方法により、非処理対照細胞と比べてウイルス複製の有無が判定される。このような方法には、例えば、当技術分野において周知の免疫蛍光法手順によって細胞中のウイルス抗原を検出すること;ウイルスポリペプチドに特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法によってウイルスポリペプチドを検出すること;RT-PCRによって、新しく転写された細胞内ウイルスRNAを検出すること;および細胞培養培地または細胞溶解物を健常な感受性の動物に注射し、HEV感染の症状がその後提示されることによって、生きた感染性ウイルス粒子の存在を検出することが含まれるが、それらに限定されるわけではない。対照細胞(核酸配列のみで処理されている)の場合に得られた結果と処理された細胞(核酸配列および抗ウイルス物質)の場合に得られた結果の比較から、あるとしたら、候補の抗ウイルス物質の抗ウイルス活性の程度が示される。当然ながら、候補の抗ウイルス物質がウイルス感染およびウイルス複製のどの1つの段階または複数の段階に対して効果的であるかを確認するために、本発明の核酸配列への曝露の前または後のいずれかに、前記物質でこのような細胞を処理してよいことを、当業者は容易に理解する

【0066】

複製するウイルスの単離

本発明はさらに、HEV慢性感染患者をウイルスの追加供給源として用いて、複製するウイルスを得る方法も提供する。典型的な方法において、ウイルスは、患者、典型的には糞便試料から単離され、かつ、細胞株、例えば肝癌細胞株を感染させるために使用される。ウイルスを細胞培養にに対して適応させるためにウイルスを連続継代する方法は、当技術分野において周知である。例えば、ウイルスは、以下のプロトコルを用いて継代することができる。糞便材料を取得し、ホモジナイズして、懸濁液を作製し、この懸濁液を遠心分離によって清澄にし、清澄にした懸濁液を使用する(または超遠心分離によってウイルスをさらに精製してもよく、その後、最適な培地中でそれを希釈してよい)。小さな培養皿またはフラスコ中の水気を切った単層細胞(例えばHepG2/C3A)の上に、一定分量の糞便懸濁液または血清を載せ、(例えば、CO₂インキュベーター中、約34.5 °Cの温度で[5時間])インキュベートする。接種材料を吸引し、細胞培養培地を添加する。同じ温度でインキュベーションを継続する。培地を除去し、週に1回または2回交換し、回収した培地においてHepG2/C3Aまたは別の所望の細胞株、例えばLLC-PK細胞を感染させることができるウイルスの量を測定する(titer)。培地中のウイルス力価が十分に高いレベル(例えば、1000フォーカス形成単位/mL)まで上昇したら、一定分量を取り出し、細胞(例えばHepG2細胞)を入れた別のフラスコまたは皿に接種するために使用し、培地におけるウイルスの所望の力価

10

20

30

40

50

に到達するまで、この手順を例えば5回繰り返す。

【0067】

cDNAクローンを得るために、一定分量の培地中のウイルスRNAを抽出し、逆転写してcDNA Aとし、通常は、オーバーラップする断片としてPCRによって増幅し、クローニングする。T7ポリメラーゼプロモーターをゲノムの5'末端に組み込み、特有の制限部位をPCRプライマーの一部として3'末端に組み込む。適切な制限酵素でcDNA断片を消化し、一つに連結して、完全長ウイルスゲノムcDNAを作製する。このcDNAを大腸菌中で増幅させ、精製し、特有の制限部位の位置で直線状にする。T7ポリメラーゼを用いて、直線状にしたcDNAをインピトロで転写する。次いで、このRNAを用いて細胞をトランスフェクトし、複製するウイルスゲノム、ウイルスタンパク質、および感染性ウイルス粒子を産生することができる。

10

【0068】

当業者は、これらのプロトコールに多くの変形があることを理解する。連続継代およびcDNAクローンに関して上記に概説したプロトコールは、プロトコールの例であり、使用されるプロトコールを限定することは意図されない。

【0069】

本発明のHEV cDNA、ウイルス、およびタンパク質の使用

本発明のcDNAクローンを用いて産生されたE型肝炎ウイルスは、当業者に公知の方法によって、トランスフェクトされた細胞から精製または部分的に精製され得る。好ましい態様において、ウイルスは、本発明の薬学的組成物およびワクチン中で免疫原として使用される前に、部分的に精製される。

20

【0070】

したがって、本発明は、哺乳動物のE型肝炎を予防するための生ワクチンまたは死菌(例えばホルマリンによって不活性化された)ワクチンにおける免疫原としての、本発明のHEV核酸配列から産生されたE型肝炎ウイルス、例えば、SEQ ID NO: 5に関してORF1中に挿入断片を有するHEV 3型株(例えば、SEQ ID NO: 1に示す配列を有するHEV 3型またはその変種)の使用に関する。いくつかの態様において、HEV 3型株ウイルスは、機能的ではないORF3を有する。このような態様において、ORF3は、変異または欠失によって不活性化されてよい。

【0071】

本発明はさらに、診断用物質およびワクチンとしての組換えHEVタンパク質の使用にも関する。免疫原として作用するワクチンは、組換え発現ベクターでトランスフェクトされた細胞、それらの細胞に由来する細胞溶解物、または発現されたタンパク質を含む培養上清でよい。あるいは、免疫原は、部分的にまたは実質的に精製された組換えタンパク質である。

30

【0072】

1つの態様において、ワクチンは、直接的な遺伝子移入によって投与される。これは、本発明の核酸配列を含む真核細胞用発現ベクターの投与によって遂行してもよい。いくつかの態様において、核酸配列は、感染性E型肝炎ウイルスをコードする、複製するcDNAである。当技術分野において理解されているとおり、本発明の感染性HEV cDNAクローンから産生されるcDNAまたは好ましくはRNAは、例えば、実施例で説明するとおり哺乳動物の肝臓組織中に直接注入することによって、哺乳動物をトランスフェクトするために使用され得る。いくつかの態様において、免疫原は、SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 5のポリヌクレオチド、またはその変種である。インピボで高効率の遺伝子移入をもたらすのに適した発現ベクターには、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクターが含まれる。発現ベクターは、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、および経口を含むかなり多数の方法によって投与することができる。

40

【0073】

いくつかの態様において、直接的遺伝子移入は、例えば、宿主生物にHEVタンパク質合成を指示できる核酸配列を含むプラスミドベースの真核細胞用発現ベクターの筋肉内注入

50

によって遂行され得る。このようなアプローチは、B型肝炎表面抗原をインビボで産生させるために以前に使用されており、表面抗原に対する抗体反応をもたらした(Davis, H. L. et al. (1993) Human molecular Genetics, 2: 1847-1851; Davis et al. (1993) Human Gene Therapy, 4: 151-159および733-740も参照されたい)。

【0074】

本発明はまた、感染性核酸配列のトランスフェクションによって産生されたウイルスのインビトロまたはインビボでの継代によって弱毒化ウイルス株を作製するための、本発明のHEV核酸配列、例えばSEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 5、またはその変種の使用にも関する。

【0075】

いくつかの態様において、本発明の核酸配列から産生されたポリペプチドまたはその断片、例えば、ORF2によってコードされるカプシドポリペプチドは、例えば、免疫原として使用され得る。1つの態様において、本発明のポリペプチドは、本発明の核酸配列または単離されたその断片から合成により組換え作製し、当技術分野において既知の方法を用いて、トランスフェクトされた細胞から精製または部分的に精製することができる。代替の態様において、これらのポリペプチドは、宿主細胞に本発明の核酸配列をトランスフェクションすることによって産生されるウイルス粒子から精製または部分的に精製され得る。

【0076】

免疫原として使用される場合、本発明の核酸配列、またはその核酸配列から産生されるポリペプチドもしくはウイルスは、本発明の薬学的組成物およびワクチン中で免疫原として使用される前に、部分的に精製されることが好ましい。ワクチンとして使用される場合、核酸配列ならびにこれらの核酸配列のポリペプチド産物およびウイルス産物は、単独で、または水、生理食塩水、もしくは一般的な緩衝媒体を含む適切な希釈剤に溶かして投与することができる。本発明によるワクチンは、皮内、筋肉内、皮下を含む様々な経路によって、またはその任意の組合せで、哺乳動物、特にヒトなどの動物に投与され得る。

【0077】

予防目的および治療目的のために投与するのに適した材料の量は、選択される経路および投与される免疫原(核酸、ウイルス、ポリペプチド)に応じて変動する。当業者は、任意の具体的な治療プロトコールのために投与されるべき量は過度に実験をすることなく容易に決定できることを理解する。本発明のワクチンは、HEVに対する抗体の適切な力価が血液中に現れるまで、一度または定期的に投与され得る。核酸免疫原の場合、予防目的のために使用されるべき核酸配列の適切な量は、約100 μ gから約5~10mgまでの範囲、多くの場合、約500 μ gから約2mgまでの範囲でよい。ポリペプチドの場合、予防目的のために使用すべき適切な量は、100ng~100 μ gでよい。ウイルスを免疫原として使用する場合、投与される量は、約 10^2 ~約 10^6 感染量でよい。このような投与は、好ましくは、HEV感染の任意の徴候の前に行う。

【0078】

本発明の製剤は、動物使用向けおよびヒト使用向けの両方とも、薬学的に許容される1種または複数種の担体および任意で他の治療的成分と共に、前述の免疫原を含む。担体は、製剤の他の成分と共存でき、薬学的組成物の受け手にとって有害ではないという意味で、「許容され」なければならない。製剤は、単位剤形で便宜的に提供されてよく、製薬分野において周知の任意の方法によって調製されてよい。

【0079】

ワクチンの製剤は、1種または複数種の補助成分を構成する担体と共に活性成分を含む。静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、または腹腔内投与に適した製剤は、受け手の血液と等張性である溶液と共に、HEV核酸、ポリペプチド、またはウイルスの滅菌済み水溶液を便宜的に含む。このような製剤は、塩化ナトリウムおよびグリシンなどの生理学的に適合性の物質を含み、かつ生理的条件に適合する緩衝化されたpHを有する水に固形活性成分を溶解して水溶液を作り、該溶液を無菌にすることによって便宜的に調製することができる。これらは、単位投与用容器または多回投与用容器、例えば、密封したアンプルまたは

10

20

30

40

50

バイアル中に入れられてよい。

【0080】

固形組成物の場合、従来の非毒性固形担体が使用されてよく、これらの担体には、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、および炭酸マグネシウムなどが含まれる。経口投与の場合、薬学的に許容される非毒性組成物は、先に列挙した担体などの通常使用される賦形剤のいずれか、および一般に10~95%の、いくつかの態様において、例えば濃度25%~75%の活性成分を混合することによって形成される。

【0081】

エアロゾル投与の場合、ポリペプチドまたは核酸は、界面活性剤および噴射剤と共に、微粉形態で供給される。当然、界面活性剤は、非毒性で、好ましくは噴射剤に可溶性でなければならない。このような剤の代表例は、カプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリン(olesteric)酸、およびオレイン酸など6~22個の炭素原子を含む脂肪酸と脂肪族多価アルコールまたはその環式無水物とのエステルまたは部分エステルである。混合グリセリドまたは天然グリセリドなどの混合エステルが使用されてもよい。また、所望に応じて、担体、例えば、鼻腔内送達用のレシチンも同様に含まれてよい。

【0082】

組成物は、担体、賦形剤、または補助剤を含んでよい。補助剤には、例えば、水酸化アルミニウム、リピドA、死滅させた細菌、多糖類、鉱油、フロイント不完全アジュバント、フロイント完全アジュバント、リン酸アルミニウム、鉄、亜鉛、カルシウム塩、アシル化されたチロシン、アシル化された糖、CpGオリゴヌクレオチド、陽イオン性に誘導体化された多糖類、陰イオン性に誘導体化された多糖類、ポリホスファジン、生分解性マイクロスフェア、TLRアゴニスト、モノホスホリルリピドA、MF59、水中油型エマルジョンのAS03およびAS04、ISCOM、ならびにクイルAが含まれる。

【0083】

本発明で使用するのに適した製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2005において見出される。

【0084】

本発明の核酸、ウイルス、およびポリペプチドがワクチンまたは接種材料として使用される場合、それらは通常、哺乳動物、好ましくはヒトなどの動物に対する単位投薬量として適切な物理的に別個の単位として存在し、各単位は、必要とされる希釈剤と共同して所望の免疫原性効果をもたらすように算出された所定の量の活性材料を含む。前記ワクチンまたは接種材料の1回用量が、少なくとも1回投与される。抗体レベルを上昇させるために、初回用量後の任意の時点に、1つまたは複数のブースター投与量を投与してよい。例えば、ブースター投与量は、初回ワクチン接種後約2週間~約6ヶ月の間の任意の時点にしばしば投与される。その後の用量は、指示されたとおりに投与してよい。この用途に有効なワクチン量および投薬スケジュールは、患者の健康、年齢、体重、投与経路などを含む様々な因子に依存する。

【0085】

1つの態様において、本発明の発現された組換えタンパク質は、哺乳動物、例えば、ヒト、チンパンジー、他の霊長類、およびブタなどにおいてE型肝炎を診断または予測するためのイムノアッセイ法において使用することができる。1つの態様において、イムノアッセイ法は、ヒトのE型肝炎感染を診断するのに有用である。

【0086】

生物試料中のHEVポリペプチドと抗体またはその断片との相互作用を検出する本質的に任意のアッセイ法を使用することができる。生物試料には、血液、血清、組織、尿試料、および生検試料が含まれる。ポリペプチドの内の1つまたは複数をビーズ、ELISAプレート

10

20

30

40

50

、ディップスティック、またはマイクロアレイなどの固体支持体に結合させてよい。

【0087】

生物試料中の抗体の有無は、抗原抗体複合体を検出するための当業者に公知の方法を用いて判定することができる。このような方法は、抗原抗体複合体に結合し、抗体以外にも抗原以外にも結合しない検出可能に標識された部分に抗体抗原複合体を接触させる段階を含む。

【0088】

本発明の核酸配列、ウイルス、およびポリペプチドはまた、哺乳動物、例えばヒトが既に感染していることが周知の診断基準に照らして示される場合、治療目的で投与され得る。

10

【0089】

本発明の核酸配列、ウイルス、またはポリペプチドが、このような治療目的のために使用される場合、接種が感染後に行われることを除いては、ワクチンとしてそれが使用される場合と同じ判定基準の多くが適用される。したがって、本発明の核酸配列、ウイルス、またはポリペプチドが、感染症の治療において治療物質として使用される場合、この治療物質は、治療される生物において治療的に有効な応答を導き出すように、該核酸配列、ウイルス、またはポリペプチドの十分な量を含む薬学的組成物を含む。投与すべき薬学的組成物の量は、その中に含まれる免疫原(核酸、ポリペプチド、ウイルス)および投与経路に応じて変動し得る。

【0090】

いくつかの態様において、抗HEV抗体は、個体に投与され得る。したがって、本発明のHEVタンパク質に反応性の抗体を、単独でまたは別の抗ウイルス物質と共にHEV感染宿主に受動的に投与して、免疫応答および/または抗ウイルス薬物の有効性を高めることができる。

20

【0091】

スクリーニングアッセイ法

本発明はまた、HEVに対する抗ウイルス活性について潜在的な抗ウイルス物質をスクリーニングするための、本発明のcDNA配列およびポリペプチドの使用にも関する。このようなスクリーニング方法は、当業者に公知である。一般に、様々な濃度の抗ウイルス物質を、ウイルス複製を支援する細胞培養システムにおけるウイルス複製の妨害に対する影響について、次いで、動物モデルシステムにおける感染力またはウイルス病原性(および低レベルの毒性)の阻害について、試験する。

30

【0092】

さらなる態様において、本発明の核酸配列は、HEVの細胞培養適応に不可欠な配列を同定する際に有用である場合があり、それゆえ、HEV複製を支援できる細胞株を同定する際に有用である場合がある。

【0093】

別の局面において、本発明は、HEVをコードするポリヌクレオチドを用いて分子または化合物のライブラリーをスクリーニングして、HEVポリヌクレオチド配列に特異的に結合する少なくとも1つの分子または化合物をその中から同定する方法を含む。このような方法は、(a)本発明のHEVをコードするポリヌクレオチドと分子または化合物のライブラリーとを、特異的結合を可能にする条件下で混合する段階;および(b)特異的結合を検出し、それによって、HEVをコードするポリヌクレオチド配列に特異的に結合する分子または化合物を同定する段階を含み、ライブラリーは、DNA分子、RNA分子、人工染色体構築物、PNA、ペプチド、およびタンパク質より選択される。

40

【0094】

ウイルス排除を評価するための方法における使用

いくつかの態様において、本発明の感染性cDNAクローンから産生されたウイルス、例えば、本明細書において説明するORF1の超可変領域中に、例えば、SEQ ID NO: 9に示すアミノ酸配列をコードする挿入断片を有するHEV 3型ウイルスを用いて、製品中に存在する可

50

能性があるHEVウイルスなどのウイルスを除去または不活性化するウイルス処理手順の有効性を評価することができる。いくつかの態様において、製品とは、水;動物が摂取するための食物(本明細書において使用される場合、液体を含む)、例えばヒトが摂取するための食物;または血液である。このような態様において、本発明の複製するcDNAクローンを用いて産生された公知の量のHEV 3型ウイルスが、分析しようとする材料、例えば、水、食物、または血液中に導入され;その材料が、ウイルスを除去および/または不活性化するために使用される方法、例えば、ろ過、熱処理、または放射線照射などに供され;ウイルス除去および/または不活性化の方法の後に、材料中に残存している添加されたHEV 3型ウイルスの量が測定される。残存しているHEV 3型ウイルスのレベルは、ウイルス処理手順の有効性を示している。

10

【0095】

ウイルス処理手順に供された製品中に残存しているHEV 3型ウイルスのレベルは、当技術分野において公知である任意の方法を用いて、例えば、イムノアッセイ法またはPCRアッセイ法を用いて測定することができる。いくつかの態様において、残存しているHEV 3型ウイルスのレベルは、定量的PCRを用いて評価される。例えば、残存しているHEV 3型ウイルスのレベルは、本発明の複製するクローン中に存在するORF1挿入断片に特異的なプライマーおよび/またはプローブを用いて測定することができる。いくつかの態様において、ウイルス処理手順の有効性を評価する際に使用するためのウイルスは、関心対象の材料に添加されたHEV 3型ウイルスを同定するためのマーカーとして使用するためにウイルスゲノム中に導入される付加的なヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を含んでよい。

20

【実施例】

【0096】

実施例1 10種の異なる種に由来する細胞の遺伝子型3感染

ある種の遺伝子型3株および遺伝子型4株がブタおよび/またはシカならびにヒトに感染することは公知であるが、宿主域の制限範囲を調査するのに適したウイルス-細胞培養システムはない。このようなシステムを開発することを目指して、HEVの遺伝子型3のKernow-C1株を、HEVに感染したHIV-1患者の糞便から半精製した(5)。糞便が採取され、ウイルスゲノム約 10^{10} 個/gを含有することが確認された際、この患者は2年間慢性的にHEVに感染していた。ウイルスを5つのヒト細胞株および1つのアカゲザル細胞株に接種し、7日後、ORF2カプシドタンパク質およびORF3タンパク質に対する抗体を用いて、免疫蛍光顕微鏡検査のために細胞を染色した。これらのウイルスタンパク質はサブゲノムmRNAから転写されるため、これらの存在は、ウイルスRNA合成が起こったことを示す。6種の培養物すべてにおいて、感染したフォーカスが見出されたが、フォーカスの数は、ヒトHuh7.5肝癌細胞もしくはPLC/PRF/5肝癌細胞、A549肺癌細胞、Caco-2腸細胞、またはアカゲザル腎臓細胞の場合よりも、HepG2/C3Aヒト肝癌細胞の場合の方が7.5倍を超える多さであったことから、HepG2/C3A細胞が最も許容的であることが示唆された。

30

【0097】

半精製したウイルスを合計7ヶ月間、HepG2/C3A細胞において6回連続的に継代した。糞便中のウイルスはA549細胞またはPLC/PRF/5細胞における場合よりもそれぞれ80倍および90倍多いフォーカスをHepG2/C3A細胞において形成したが、継代4回目までに、このウイルスは、これらの他の2種の細胞株における場合よりも400倍および500倍多いフォーカスをHepG2/C3A細胞において作り出した。糞便ウイルスと6回継代ウイルスによる感染性ウイルスおよびビリオンRNAの産生を比較したHepG2/C3A細胞における増殖曲線から、糞便ウイルスの連続継代により、HepG2/C3A細胞においてより効率的に増殖できるウイルスが作製されたことが確認された(FFUに対する $p=0.008$ およびRNAに対する $p=0.013$)(図1)。14日目に、糞便ウイルスは培地100 μ L当たり89FFUおよび 1.3×10^6 GEのRNAを放出して、1FFU/15,083GEという比感染力(specific infectivity)を与えた。14日目に、6回継代ウイルスは、100 μ L当たり3203FFUおよび 46.1×10^6 GEのRNAを放出して、1FFU/14,399GEという比感染力を与えた。A549細胞またはPLC/PRF/5細胞において増殖するように糞便ウイルスを適応させようとする同様の試みは成功しなかった。

40

50

【 0 0 9 8 】

また、ATCCから入手可能である様々な非霊長類細胞に感染する能力についても、糞便ウイルスを試験した。遺伝子型3ウイルスはブタおよびシカから単離されており、3種のブタ腎臓細胞株はそれぞれ、ORF2およびORF3で染色されるフォーカスを数多く含んでいたのに対し、シカ細胞株では中ぐらいの数であった(データ不掲載)。珍しいことに、ウシ、マウス、ニワトリ、ネコ、イヌ、およびウサギの細胞培養物もまたそれぞれ、免疫蛍光法によって確認したところ、ORF2タンパク質およびORF3タンパク質の両方に関して染色される細胞を少し含んでいた(データ不掲載)。

【 0 0 9 9 】

ヒト細胞、ブタ細胞、およびシカ細胞における遺伝子型1および遺伝子型3の力価測定 10

遺伝子型1に対する宿主域の制限という問題を再考するために、遺伝子型1(Sar-55、Akluj)および遺伝子型3(US-2、糞便Kernow-C1、6回継代Kernow-C1)の入手可能な最も力価の高い貯蔵物の段階希釈物をHepG2/C3A細胞、LLC-PK1ブタ細胞、およびシカ細胞に接種し、3日後に、ORF2タンパク質およびORF3タンパク質に関して培養物を免疫染色した。最後の1つまたは2つの陽性希釈物におけるORF2陽性フォーカスの数を用いて、感染力価を算出した(図2)。予想された通り、両方の遺伝子型1株がHepG2/C3A細胞に感染したが、驚くべきことに、これらは、効率は低いながらLLC-PK1細胞にも感染した(Sar-55の場合の $p=0.016$ およびAklujの場合の $p=0.009$)。一方、両方の遺伝子型3株が、HepG2/C3A細胞に感染する場合よりも効率的に、LLC-PK1細胞に感染した(糞便の場合の $p=0.006$ 、6回継代の場合の $p=0.010$ 、およびUS-2の場合の $p=0.008$)。HepG2/C3A細胞において増殖するように6回継代ウイルスを適応させたにもかかわらず、このウイルスは依然として、ヒト細胞よりも多くのブタ細胞に感染した。同様の結果(US-2に関して1つの例外あり)が複数回の実験で得られたが、ウイルス力価、およびしたがって比率は、実験によって変動した(表3)。この変動があるため、比較用の各アッセイ法に少なくとも1種の遺伝子型1株および1種の遺伝子型3株を含めることが必要である(表3)。 20

【 0 1 0 0 】

糞便Kernow-C1ウイルスの力価と比べて6回継代ウイルスの力価の方が低いことは、細胞培養されたウイルスの比感染力の方が低いことを反映している。図1の培養ウイルスのHepG2/C3A細胞における比感染力が約1FFU/15,000GEであったのに対し、糞便中Kernow-C1ウイルスのこれら同じ細胞における比感染力は1FFU/450GEであった。 30

【 0 1 0 1 】

シカ細胞の感染はもっと複雑であった。US-2は、この実験ではシカ細胞に感染しなかったが、他の各株は、LLC-PK1細胞における力価より低い8分の1~11分の1の力価で感染した。興味深いことに、ORF2タンパク質およびORF3タンパク質の二重染色により、遺伝子型1株ではORF2カプシドタンパク質産生が不十分であったが、遺伝子型3株ではそうではないことが示唆された。各ウェル中の染色されたシカ細胞すべてを数えた。遺伝子型1のORF3タンパク質を含む細胞の3分の2は、検出可能なORF2タンパク質を有していなかったのに対し、遺伝子型3のORF3タンパク質を含む細胞はすべて、ORF2タンパク質を含んでいた(図3A)。この不均衡は、遺伝子型1のSar-55に感染したヒト細胞では認められなかった。ORF3タンパク質について陽性とランダムに採点された細胞73個の中で、検出可能なORF2タンパク質を欠いていたのは1個の細胞のみであった。ORF2およびORF3の翻訳は、同じバイシストロン性のmRNA上にある狭い間隔で配置されたメチオニンコドンから開始するため(16)、この結果から、遺伝子型1株に感染したシカ細胞ではORF2タンパク質合成を犠牲にしてORF3タンパク質合成の開始を好む翻訳傾向があるが、遺伝子型3株に感染したシカ細胞ではそうではないことが示唆された。 40

【 0 1 0 2 】

シカ細胞におけるウイルスタンパク質産生は、FACS解析を可能にするのに十分なほど活発ではなかった。したがって、CMVプロモーター駆動性mRNAをトランスフェクトされた細胞のFACS解析を実施して、開始傾向を確認した。野生型Sar-55、野生型Kernow-C1、および最初の29個のヌクレオチドをKernow-C1のものに変異させたSar-55のバイシストロン性m 50

RNAを、S10-3ヒト肝癌細胞およびシカ細胞において一過性に発現させた。ORF2タンパク質およびORF3タンパク質について別々に染色した培養物のFACS解析から、CMV-Sar(p=0.003)よりも、変異体CMV-MT29(p=0.024)およびCMV-Kernow(p=0.052)の方が、ORF3タンパク質に対するORF2タンパク質の相対的産生量が顕著に大きいことが実証された(図3B)。CMV-SarとCMV-MT29とはこれら29個のヌクレオチドが異なるだけであったため、変異体によるORF2の産生比率の上昇から、Sar-55 ORF2カプシドタンパク質の翻訳がシカ細胞において減少していることが示唆された。実際、同じ29ヌクレオチド変異を感染性完全長Sar-55クローン中に導入して(pSK-E2-MT29)、それおよび野生型Sar-55転写物をシカ細胞にトランスフェクトし、5日後にORF2タンパク質産生およびORF3タンパク質産生について免疫顕微鏡法によって採点した場合、ORF3/ORF2を含む細胞の平均比率は、野生型の3.68から変異体では0.4まで減少し(p=0.004)、したがって、翻訳開始部位の29ヌクレオチドの遺伝子型3配列が、シカ細胞におけるSar-55のORF2産生を増大させるのに十分であることが確認された(表1)。比較すると、野生型クローンまたは変異体クローンのいずれかをトランスフェクトされたヒトS10-3細胞では、ORF3/ORF2を含む細胞の比率は同様の値が得られた(表2)。

【0103】

実施例2 HepG2/C3Aに適應させたウイルスおよび宿主細胞組換え

糞便中のウイルスおよび6回継代ウイルスのRT-PCRコンセンサス配列を決定した。ORF1の超可変領域(HVR)中のアミノ酸58個のインフレーム挿入断片に加えて、16個のアミノ酸差異(ORF1中に10個、ORF2中に5個、およびORF3中に1個)によって(22)、6回継代ウイルスは糞便ウイルスと異なっていた(表4)。Blast検索により、挿入された配列は様々な種で高度に保存されているリボソームS17eスーパーファミリーに属するものと同定された。ヌクレオチド170個の内の167個およびアミノ酸57個の内の53個がヒトリボソームタンパク質S17(Genbank DQ896701.2)のものと同であった(図4)のに対し、ブタのS17タンパク質(AY5500731.1)の場合はヌクレオチド171個の内の155個のみであった。ペアにしたHEVプライマーおよび挿入配列プライマーを用いたRT-PCRによって、挿入物を有するウイルスゲノムが元の糞便懸濁液中で検出されたことから、患者または以前の宿主のいずれかにおいて二重組換え事象が起こっていたことが示された。糞便中の組換えゲノムは、糞便に由来するRT-PCR産物または感染後70日目の培地中の初回継代ウイルスに由来するRT-PCR産物の直接的配列決定によって検出されなかったことから、少数派の種であったことは注目に値する。HEV特異的プライマーを用いて、完全なHVRを糞便から増幅させ、クローニングし、配列決定した。配列決定したクローン120個の内で、挿入断片を含むものは1つもなかった。

【0104】

挿入された配列またはそのサイズが関連しているかを判定するために、挿入断片配列を、センスの向き、逆向き、または逆相補的な向きのいずれかで、Sar-55感染性クローンの超可変領域中にインフレームでクローニングし、インビトロで転写されたゲノムをS10-3細胞にトランスフェクトした。野生型ゲノムおよびセンスの向きの挿入断片を有するものは区別がつかず、計数できないほど多くのウイルス陽性細胞をもたらした。一方、逆にした挿入断片および逆相補的な挿入断片を含むゲノムをトランスフェクトされた細胞を含むウェルは、免疫蛍光顕微鏡検査法によって測定したところ、ウイルス陽性細胞をそれぞれ16個および12個しか含まなかった(データ不掲載)。

【0105】

実施例3 複製するクローンの調製

HEVに感染したHIV-1患者の半精製糞便中に存在するKernow-C1ウイルスゲノムの全ヌクレオチド配列を、ブタE型肝炎ウイルス株3(Meng et.al)の完全長cDNAクローンに由来するプライマーを最初に用いた、SuperScript II逆転写酵素(Life Technologies)、PrimeStar HS DNAポリメラーゼ(TAKARA)、および2ステップRT-PCRキット(QIAGEN)を用いたRT-PCRによって決定した。その後のプライマーは、新しく得られた配列に基づいて設計した。最端の5'配列を5'RACEキット(Life Technologies)を用いて決定した。

【0106】

完全長cDNAクローン[K1]を構築するために、半精製した糞便ウイルスを接種されたHep

10

20

30

40

50

G2細胞の培地に放出された1回継代ウイルスからTRIZOL LS試薬(Life Technologies)を用いてKernow-C1ウイルスRNAを抽出した。SuperScript II逆転写酵素(Life Technologies)、Herculase HotStart Taq(Stratagene)、およびPrimeStar HS DNAポリメラーゼ(TAKARA)を用いてKernow-C1ゲノムを増幅させた。Kernow-C1ゲノム全体に渡る合計6個のオーバーラップする断片を増幅させ、融合PCRによって連結して2個のオーバーラップする断片とし、続いてこれらの断片を、各断片中に存在する独特の制限部位で結合させて一つにした。コードされるゲノムの5'末端を、独特なXbaI部位およびT7 RNAポリメラーゼコアプロモーターを有するように人工的に設計した。3'末端は、後に独特なMluI[プラスミド直線化のための部位]、さらにその後HindIIが続く16個のアデノシンからなるストレッチを含むように人工的に設計した。完全長ゲノムcDNAをpBlueScript SK(+)+プラスミド(Stratagene)のポリリンカーのXbaI部位とHindII部位の間に結合させた。

10

【0107】

超可変領域(HVR)中のアミノ酸58個のインフレームの挿入物を明らかにする2ステップRT-PCRキット(QIAGEN)を用いて、6回継代物のRT-PCRコンセンサス配列を決定した。Blast探索によって、この挿入物はヒトリボソームのタンパク質S17に最も近縁であることが確認された。

【0108】

HepG2/C3A細胞における6回の連続継代によって選択されたウイルスがヒトS17遺伝子の一部分を含む組換えウイルスであることは、6回継代ウイルスの配列決定をするまで(上記)、発見されていなかった。ウイルス/ヒトプライマー対を用いたネステッドRT-PCRにより、171ntの挿入されたS17配列を含むウイルスゲノムを糞便中に検出することができたが、これらは非常に小数派の疑似種を構成したため、糞便接種材料中のウイルスのHVR領域のcDNAクローン120個中には現われなかった(データ不掲載)。この挿入断片を含むウイルスが一連の継代のいつに最初に出現し、優占種にいつなったかを特定するために、6つの細胞培養継代段階のそれぞれにおける培地中のウイルスのHVR領域をRT-PCRによって増幅させ、クローニングし、配列決定した。

20

【0109】

配列決定解析の結果から、初回継代物に由来するクローン11個の内の2個がS17配列を既に含んでいたこと、および2回継代以降、クローンの大多数にS17配列が存在することが示された(表5)。驚くべきことに、114nt長の異なる哺乳動物遺伝子挿入断片が、初回の細胞培養継代物に由来するクローン11個の内の他の5個に存在しており、この場合、ほぼ同一の配列が、糞便由来のクローン120個の内の2個に存在した。この114ヌクレオチド長の配列は、GTPアーゼ活性化タンパク質遺伝子配列の中央に由来する10ntを欠いており、再編成された遺伝子セグメント(GenBank AB384614.1)からなっていた。この遺伝子セグメントでは、GTPアーゼnt3009~3105の後に3'末端のGTPアーゼnt2981~3008が続き、リーディングフレームは、この配列が、挿入された場合に、公知のあらゆる非冗長タンパク質データベースに対してこの配列を探索しても何にも一致しない無関係なアミノ酸配列をコードするように変更されていた。しかしながら、この挿入物は、後続の2回継代~6回継代に由来するクローンのいずれにおいても検出されなかった。

30

【0110】

感染性cDNAウイルスクローン

培養細胞の培地は、これらの細胞に感染し、その中で複製サイクルを完了させることを最も上手くできるウイルス疑似種のメンバーを含むはずである。したがって、元のKernow株を含む便懸濁液を111日前に接種されたHepG2/C3A細胞の培地(1回継代ウイルス)から増幅させたクローニングしていないcDNA断片から、Kernowウイルスの最初の完全長cDNAクローンを構築した。このKernow 1回継代cDNAクローンp1は、S17挿入断片を欠いており(GenBank HQ389543)、糞便中のウイルスのコンセンサス配列とアミノ酸15個が異なっていた(表7)。これをS10-3肝癌細胞中にトランスフェクトし、5~6日後に、免疫蛍光顕微鏡検査法により、ORF2タンパク質について染色された細胞についてこれらをモニターした。検出可能なORF2タンパク質を産生したのは、1回継代クローンのインビトロ転写物をトランスフ

40

50

エクトされたS10-3細胞の2%未満であったことから、このウイルスゲノムは感染性ではあるが、活発な複製に寄与するエレメントは欠いていることが示唆された。p1/S17を得るためにcDNAクローン中にS17挿入断片を組み込んだところ、トランスフェクトされる細胞の数は増加したが、レベルは約10%未満のままであった。

【 0 1 1 1 】

より活発なウイルスを誘導するため、および細胞培養適応に寄与した領域を特定するために、p1/S17 cDNAの好都合な制限断片を、細胞培養に適応させた6回継代ウイルスから増幅させたクローニングしていないPCR産物の疑似種に順次置換した(表6)。これらの新規完全長ゲノムの複数のクローンに由来する転写物をS10-3細胞中にトランスフェクトし、ORF2産生について免疫蛍光顕微鏡検査法によって検査した。トランスフェクトされた細胞を最も高い比率で産生するクローンを次の置換のための骨格として使用し、この工程をさらに4回繰り返した。最後に、同じ実験において、すべてのクローンをフローサイトメトリーによって比較した(図5)。最初の3回の順次的断片置換により、3'のORF2領域中および非コード領域中に(nt6812~ポリA)、3'のORF1およびORF2/ORF3オーバーラップ中に(nt4608~6812)、ならびにORF1の5'側の3分の1中に(nt671~2182)、変異が導入されていた。これら3つの断片の中で、6812-A_n置換だけがトランスフェクション効率を有意に上昇させた(図5)。nt4608~6812に及ぶ6回継代PCRアンプリコンの中で、トランスフェクションレベルを最も押し上げた配列は、ORF3中のメチオニンコドン2つだけ(aa1およびaa69)をなくす変異を含んでいた(表6)。免疫蛍光顕微鏡検査法により、このcDNAクローンおよび後続の3種のcDNAクローンに由来するウイルスはORF3タンパク質を産生しないことが確認された(データ不掲載)。促進効果が最も大きい6回継代断片はnt2182~3063にまたがり、Xドメイン中に天然に存在するアミノ酸変異3つおよびHVR中に1つのプロリン欠失を含んでいた。アミノ酸配列を保存しつつ、PCR解析および配列解析を大きく妨げるHVR中のC残基のかたまりを分裂させるために、この断片中のさらに4つのプロリンコドンを部位特異的変異誘発によってCCAコドンに変更した。5回目の断片置換(nt3063~4608)は、ヘリカーゼ遺伝子およびポリメラーゼ遺伝子の高度に保存された領域を含み、いかなるアミノ酸変化も導入せず、明らかな効果は有していなかった(p=0.067)。最後に、p6ウイルスがORF3タンパク質を産生できるように、ORF3のメチオニン開始コドンを修復した。メチオニンコドンの存在または非存在は、S10-3細胞のトランスフェクションレベルに明らかな影響は与えなかった[p6/ORF3ヌルのトランスフェクションレベルとp6のトランスフェクションレベルを比較されたい(p=1.0)]。このクローンは、挿入断片を除いて、便コンセンサス配列とはアミノ酸16個、p1とはアミノ酸25個、および6回継代コンセンサス配列とはアミノ酸2個のみ(ORF1中のaa598=RからCおよびORF2中のaa593=TからA)が違っていた。最終のp6クローンの転写物は通常、10~45%の間のS10-3細胞にトランスフェクトした。

【 0 1 1 2 】

Xドメインの機能は不明であり、HVRのプロリンコドン中のCからAへの変化は天然ではなく人工的に作り出されたため、Xドメイン中の3つの変異またはHVRの断片2182~3063中のCからAへの同義変異がトランスフェクションの促進に最も重要であるかを判定した。プロリンコドンの復帰変異は配列決定の問題を再びもたらすと考えられるため、Xドメイン中のアミノ酸コドンを復帰変異のために選択した。Xドメイン中の3つの変異すべてを、p1 cDNAクローン中に存在する元のコドンに復帰変異させ、トランスフェクション後6日目に、フローサイトメトリーによってトランスフェクションレベルを定量した(図6)。復帰させた3つのXドメイン変異を含むクローンに由来する転写物は、S10-3細胞をトランスフェクトするにあたって、p6 cDNAクローンに由来する転写物より有意に(P=0.0006)効率が低く、HVRプロリン変異およびXドメイン変異の両方を欠く671-2182クローンとは有意な差がなかった(P=0.12)ことから、ポリC鎖を妨げる人工的に設計した変化はトランスフェクションに最小限の影響を与えたのに対し、X領域中の3つの変異の内の1つまたは複数は重要な役割を果たすことが示唆された。

【 0 1 1 3 】

S17配列の影響が、p1 cDNAクローン中へのその挿入後に観察されるトランスフェクシ

10

20

30

40

50

ンレベルの中程度の上昇に限定されているかを確認するために、すべての点変異を含むp6 cDNAクローンからS17配列を選択的に除去して、p6delS17を得た。フローサイトメトリーによって、p1ウイルスゲノムにS17配列を付加するとこれらのゲノムによるトランスフェクション効率に有意に上昇するが、そのレベルは組換えp6ゲノムによって達成されるレベルには近づかないことが確認された(図7)。驚くべきことに、細胞培養に適応させたp6 cDNAクローンからS17配列を除去すると、ゲノム転写物のトランスフェクション効率が劇的に低下し、p1 cDNAクローンのレベルよりわずか3倍だけ良いレベルとなった(図7)。この結果から、連続的クローンのトランスフェクション効率が徐々に向上するのに関与している点変異は、S17配列の非存在下ではたいてい効果が無いことが示唆された。

【 0 1 1 4 】

ORF2タンパク質免疫染色に基づくフローサイトメトリー解析により、検出可能なORF2タンパク質を産生する細胞の比率は明らかになったが、これらは産生されたORF2タンパク質の量の定量的比較もORF2合成の持続期間の定量的比較も提供しなかった。フローサイトメトリーデータを確認し拡張するために、ORF2の5'部分をインフレイムのガウシアルシフェラーゼレポーター遺伝子で置換してp6/lucを得た。このルシフェラーゼは、細胞培養培地中での分泌および蓄積をもたらすシグナル配列を有する。したがって、同じ培養物から複数の時点を取ることができる。

【 0 1 1 5 】

機能的なポリメラーゼまたはウイルスRNAを合成できない変異した非機能性ポリメラーゼのいずれかを含むp6/lucウイルスによって培地中に分泌されたルシフェラーゼの量を測定することによって、ルシフェラーゼシステムを確認した。p6/lucポリメラーゼ変異体をトランスフェクトされたS10-3細胞に由来するまたはトランスフェクトされていないS10-3細胞に由来する培地中のルシフェラーゼシグナルは、2日目のピーク時に111単位/24時間未満であったのに対し、p6/lucをトランスフェクトされた細胞の培地中のルシフェラーゼシグナルは、1日目の2163単位/24時間から、4日目~6日目には3600万単位/24時間を超えるまでに上昇した(データ不掲載)。

【 0 1 1 6 】

したがって、ルシフェラーゼ産生は、サブゲノムmRNA中のルシフェラーゼ遺伝子のORF2位置に基づいて予測されるように、ウイルスRNA合成を必要とする。次いで、p6/lucウイルスによるルシフェラーゼ産生を、S17挿入断片を欠失させるようにまたは3つのX遺伝子変異をなくすように変異させたp6/lucウイルスによるルシフェラーゼ産生と比較した。S17挿入断片を含むかまたは含まないp6/lucウイルスによるルシフェラーゼの産生は、トランスフェクション後6日目にピークに達したが、p6/luc(del S17)単位に対するp6/luc単位の比はだんだん上昇し、7日目に52倍に達し、したがって、S17挿入断片が増殖を顕著に有利にし、細胞培養適応の変異となることが裏付けられた(図8A)。さらに、3つのX遺伝子復帰変異に関するルシフェラーゼデータは、フローサイトメトリー解析のデータと一致していた(図8B)。p6/luc X遺伝子復帰変異体をトランスフェクトされた培養物の方が、p6/lucウイルスをトランスフェクトされた培養物よりもルシフェラーゼ産生量が少なかった。図8Aおよび図8Bの両方に示すとおり、9日目のルシフェラーゼ値が、p6/lucウイルスでは実質的に減少したが、変異体ではほぼ横ばい状態のレベルのままであったことに注目することは興味深い。

【 0 1 1 7 】

同義変異によってトランスフェクションは減少しなかった

S17挿入断片の促進効果は、RNA配列またはタンパク質配列のいずれかに起因し得る。これらの可能性を区別するために、2つのクローンにおいて、MからIへの2つの変化以外は、コードされるAAを変更せずに、3番目の塩基(S17中の58個のコードンの内の93%および70%)を変化させた(プリンからプリンおよびピリミジンからピリミジン)。予測されるRNA構造および Gはp6(G=-120.38)およびお互い(それぞれクローン1番の G=-102.99、クローン2番の G=98.97)のものとは異なっていたにもかかわらず、これら2つのクローンのそれぞれに成功裡にトランスフェクトされた細胞の数は、p6の場合と有意な差がなかった(図9)

10

20

30

40

50

。したがって、促進効果はタンパク質レベルで生じると考えられた。

【0118】

挿入断片のサイズの影響

以前の研究によって、細胞培養においてKernowウイルスを増殖させるにあたってのS17挿入断片の重要性が実証されたが、それがどのように機能するかに関する見識はまったく提供されなかった。便接種材料の最初の継代によって、細胞培養におけるKernow株の増殖に対してGTPアーゼ挿入断片が促進効果を有する可能性を支持する証拠が与えられていたため、p6クローンにおいてS17挿入断片のものの代わりにこの挿入断片を用いて、その効果を評価した。114ntのGTPアーゼ挿入断片によって、トランスフェクトされた細胞の数は増加したが、その効果は171ntのS17挿入断片の約半分にすぎなかった(図10A)。挿入断片それ自体の長さが要因であるかを判定するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)のN末端またはC末端のアミノ酸58個をコードする配列をS17配列の代わりに用いた。GFPは多くの細胞型において多くの相手との融合タンパク質として発現された場合に比較的害のないことが示されているため、GFPを選択した。そして、実際、コード領域全体をS17挿入断片の3'末端にインフレームで融合した場合にGFPが産生することが蛍光顕微鏡検査法によって示された(データ不掲載)。しかしながら、GFPのN末端アミノ酸またはC末端アミノ酸のaa58個をコードする174ntのいずれも、S10-3細胞のトランスフェクションレベルに検出可能な影響を有していなかった(図10A、10B)。したがって、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸の数それ自体は、決定要因ではなかった。p6中のS17挿入配列からヌクレオチドの半分を除去して、S17挿入断片のN末端側の半分、C末端側の半分、または中央部分をコードする87~90ntの配列を得ることによっても、サイズの影響を調べた。3種の構築物はすべて、同様の程度まで細胞をトランスフェクトし、その程度は平均して、挿入断片全体が存在する場合の2分の1~6分の1であり、挿入断片がない場合の2.5倍であった(図10C)。最後に、別のE型肝炎慢性感染患者に由来する別の遺伝子型3株のHVR中に挿入されることを本発明者らが発見した、別の哺乳動物遺伝子配列(S19リボソームタンパク質)のヌクレオチド117個を、p6クローンにおいてS17配列の代わりに用いた。この異なる遺伝子型3株におけるS19配列を有しているゲノムは、S17を含むKernowゲノムと同じ程度に、HepG2/C3A細胞中での培養の間に選択されたが、この遺伝子型3株からKernow株にこの配列を移入しても、あまり大きな促進は得られなかった(図10D)。

【0119】

p6はブタ細胞およびヒト細胞の両方に感染できるウイルスをコードする

トランスフェクションのために使用されるS10-3細胞および6回継代ウイルスを適応させたHepG2/C3A細胞の両方とも、ヒト肝癌細胞であり、したがって、p6ウイルスが元の糞便接種材料の能力を保持して、ブタ細胞においても増殖するか確認することは重要であった。p6およびp6delS17の転写物をLLC-PK1ブタ腎臓細胞中にエレクトロポレーションし、5日後にフローサイトメトリーによって検査した。ブタ細胞において両方の構築物によってORF2タンパク質が産生されたことから、マイナス鎖ゲノムおよびサブゲノムmRNAの両方それぞれによって合成されていたことが実証された。31%を超えるブタ細胞がp6クローンによってトランスフェクトされたのに対し、S17挿入断片を欠くp6クローンによっては12%であり、したがって、S17配列がヒト細胞にしたように、ブタ細胞のトランスフェクションを促進することが実証された(図11A)。次に、p6ウイルスそれ自体のブタ細胞感染能力を試験した。HepG2/C3A細胞中で増殖させた2つの異なるp6ウイルス群をHepG2/C3A細胞およびLLC-PK細胞において並行して力価測定した(図11B)。どちらの場合も、感染価はヒト細胞よりもブタ細胞においての方が高かったが、それら2つの調製物の差異は変動し、1つ目の場合は有意性に達した($p=0.0087$)が、2つ目の場合は有意性に達しなかった($p=0.064$)。しかしながら、HepG2/C3A細胞における力価でLLC-PK細胞における力価を割った比はそれぞれ2.4および1.5であり、クローン化されていない6回継代ウイルス疑似種の2種の調製物に関して以前に報告されている5.49および2.84という比と実質的に異ならなかった。明らかに、p6 cDNAクローンは、遺伝子型3のHEVの2種の主な宿主種のそれぞれに由来する培養細胞に感染できるウイルスをコードした。

【 0 1 2 0 】

遺伝子型1株に対するS17配列の影響

遺伝子型1のcDNAクローンSar55に由来する転写物は、S10-3細胞を容易にトランスフェクトしたが、細胞培養において増殖するようにウイルスを適応させるための最初の実験は失敗に終わった。以前の実験により、HVR中にp6ウイルス由来のS17配列を含む組換えSar55ゲノム(Sar55/S17)がS10-3細胞をトランスフェクトできることが実証されていたが、挿入断片のないSar55ゲノムとの定量的比較は実施されていなかった。したがって、Sar55転写物およびSar55/S17転写物をS10-3細胞中にトランスフェクトし、5日後にこれらの細胞をフローサイトメトリーにかけた。どちらの転写物のセットも同様の数のORF2陽性細胞をもたらしたことから、S17配列はこのシステムにおいてSar55ゲノムのトランスフェクション効率を高くもせず、低くもしないことが示唆された(図12A)。

10

【 0 1 2 1 】

Kernowウイルスは以前にこのような多様な宿主域を提示していたため(上記の例を参照されたい)、p6転写物を、ハムスターBHK-21細胞をトランスフェクトする能力に関して試験し、低効率ではあるものの(BKH-21およびS10-3に対してそれぞれ3.8%および30.1%)、ORF2陽性細胞をもたらすことを見出した。したがって、遺伝子型1ウイルスの限定された宿主域を考慮すればBHK-21細胞が宿主である見込みは少なかったが、BHK-21細胞をトランスフェクトする能力に関して、Sar55転写物およびSar-55/S17転写物もフローサイトメトリーによって試験した。驚くべきことに、ハムスター細胞がSar55ゲノムによってトランスフェクトされただけでなく、S17挿入断片を含めることにより、トランスフェクトされた細胞の数はほぼ7倍に増加した(図12B、 $P < 0.0001$)。S17挿入断片によるトランスフェクションの促進を、独立した実験において免疫蛍光顕微鏡検査法によって確認した(データ不掲載)。

20

【 0 1 2 2 】

p6は、HepG2/C3A細胞中で増殖しHepG2/C3A細胞間で伝播するウイルスをコードする。p6 cDNAゲノムは、HepG2/C3A細胞中で増殖するように適応させたウイルスに由来したため、このcDNAクローンによってコードされるウイルスは、これらの細胞の培養物中で効率的に複製し伝播すると予測された。一方、ORF3タンパク質をウイルス放出に関係づける以前の研究から、ORF3を産生できないp6ウイルスゲノムは、p6ゲノムがするのと同じくらい多くの細胞をトランスフェクトし得るが、このウイルスは他の細胞に伝播しないと考えられることが示唆された。p6ウイルスゲノムおよびp6/ORF3ヌルゲノムをHepG2/C3A細胞中にエレクトロポレーションし、ウイルス産生およびウイルス伝播をフローサイトメトリーによってモニターした。驚くべきことに、p6ウイルスおよびORF3ヌル変異体は同様のパターンを示し、どちらも培養の間一貫して、効率的に複製し伝播すると考えられた。どちらの場合も、ORF2タンパク質陽性細胞の比率は、5日目の約15%から14日目に70%を超えるまでに増加した(図13)。独立した実験からも同様の結果が得られ、5日~15日の間に陽性細胞の比率は、p6ウイルスの場合は12.4% (+/-1.96) から59.7% (+/-0.87) に増加し、ORF3ヌル変異体の場合は13.3% (+/-0.31) から67.8% (+/-5.57) に増加した。これらの結果から、p6クローンが細胞培養に適応させたウイルスを実際にコードすることが実証されたが、2種のウイルスの細胞間伝播のレベルが同様であることは不可解であった。なぜならば、効率的なウイルス放出には機能的ORF3タンパク質が必要であることが報告されていた(13、14)からである。これらの報告において、ORF3タンパク質の非存在下でのウイルス放出は、存在下でのウイルス放出の約10%にすぎなかった。9日目の培地からRT-PCRによって増幅させたヌル変異体ゲノムのORF3領域の配列解析により、メチオニンコドンは存在せず、細胞の免疫蛍光顕微鏡検査によってORF3タンパク質は検出されないことが確認された(データ不掲載)。しかしながら、2種の培養物に由来する培地を用いて実施した感染性フォーカスアッセイ法により、p6ウイルスは平均11630FFU/mLであり、ORF3ヌル変異体は2倍多い23200FFU/mLであることが確認された(データ不掲載)。リアルタイムRT-PCRによる培地中のウイルスゲノム数の測定は最も意味深かった。ORF3ヌル変異体の場合に培地中に放出されたウイルスゲノムの数はp6ウイルスと比べて実際少なく、約10分の1であった。FFU当たりのウ

30

40

50

イルスゲノム数を計算することにより、ORF3ヌル変異体ウイルスの比感染力がp6ウイルスそれ自体のものより約20倍強いことが示された。したがって、ORF3欠如に起因する細胞からの放出の減少は、感染性の増大によって相殺され、したがって、ヌル変異体は培養の間じゅう、親p6ウイルスと同じくらい効率的に伝播することができる。

【 0 1 2 3 】

概要-実施例3

HepG2/C3Aヒト肝癌細胞において増殖するように適応させたE型肝炎ウイルスの感染性cDNAクローンを構築した。このウイルスは、適応させたウイルスの超可変領域が、ヒトS17リボソームのタンパク質のアミノ酸58個をコードする171ヌクレオチドの挿入物を含むという点で珍しかった。6回の連続継代から得られたウイルスの解析によって、この挿入断片を有するゲノムが最初の継代の間に選択されることが示されたことから、この挿入断片が増殖を顕著に有利にすることが示唆された。このcDNAからのRNA転写物およびそれらによってコードされるウイルスは、この人畜共通感染性ウイルスの主な宿主種であるヒトおよびブタの両方に由来する細胞に感染性であった。変異誘発研究により、S17挿入断片が細胞培養適応の主要要因であることが実証された。挿入断片中に54個の同義変異を導入しても検出可能な影響はなく、したがって、RNAではなくタンパク質が重要な構成要素として関係づけられた。この挿入断片を50%短縮すると、トランスフェクションレベルは約3分の1に低下した。S17配列を別のリボソームタンパク質配列またはGTPアーゼ活性化タンパク質配列で置換すると、トランスフェクションレベルはいくらか上昇したが、緑色蛍光タンパク質のアミノ酸58個で置換しても効果はなかった。遺伝子型1の株の超可変領域中にS17配列を挿入した場合、S17配列はヒト肝癌細胞のトランスフェクションに影響を及ぼさなかったが、このキメラゲノムは、ハムスター細胞において複製するめざましい能力を獲得した。

【 0 1 2 4 】

考察 - 実施例1および実施例2

Kernow-C1株は、慢性感染患者に由来するHEV株のうちで初めて細胞培養において増殖させられたものである。他の独特の特徴の中でもとりわけ、Kernow-C1株は、例外的に広い宿主域を提示した。これは、非霊長類種由来の細胞に感染することが判明している最初のHEV株であるだけでなく、ニワトリおよびマウスほどの多様な動物に及ぶ異種間感染の範囲は全く予想外であり、現代の知識に基づいては予測されなかったであろう。使用されたウイルスのどれもブランク精製されておらず、ゆえに、各接種材料が混合集団である可能性があることに留意されたい。したがって、霊長類細胞に感染するウイルスは、他の種の細胞に感染するものと実質的に異なる場合がある。活発な複製能力を有する感染性cDNAクローンが一度構築されると、生物学的多様性および細胞培養によって獲得される変異の影響を研究することが可能になるはずである。

【 0 1 2 5 】

6回継代ウイルスは十分な細胞外ウイルスを産生して、以前不可能であった実験を可能にしたものの、細胞培養されたHEVの低い比感染力は、いくつかの困難を強いる。細胞培養において産生された遺伝子型1(14)ウイルスおよび遺伝子型3(13)ウイルスの両方も、それらがORF3タンパク質を含み、それらのピリオンが、糞便ピリオンを容易に沈降させる抗ORF2抗体によって沈降させられないという点で、糞便中に排泄されたものとは顕著に異なっていた。

【 0 1 2 6 】

遺伝子型3のウイルスがヒト細胞よりもブタ細胞により効率的に感染するということの証明は、この遺伝子型のヒト感染が散発的であるのに比べて、ブタ感染は世界中で遍在していることの証明と一致している(18)。本研究においてヒト細胞をブタ細胞またはシカ細胞と比較して立証された、遺伝子型1株および3株の反対の親和性の程度および一貫性から(図2)、本明細書において説明する細胞培養システムが異種間HEV感染に影響を及ぼす要因をさらに研究するのに有用であることが示された。

【 0 1 2 7 】

ORF2タンパク質およびORF3タンパク質の産生がどのように調節されるかという疑問には答えが出ていないが、シカ細胞においてSar-55 ORF2産生を嫌う傾向が観察され、Kernow-C1株由来の短い5'RNA配列の導入後にその傾向が改善されることから(図3B)、狭い間隔で配置されたコドンからの翻訳の調整は、宿主種によって顕著に異なる場合があり、これが、宿主域を制限する1つのメカニズムを提供し得ることが示唆される。明らかに、ORF2カプシドタンパク質合成を阻害すると、その他の細胞に感染し得るビリオンを組み立てる能力が弱められると考えられる。

【0128】

翻訳開始のためのAUGコドンの選択は、位置およびKozakによって定められた規則に従うコドンに隣接したヌクレオチドの指示を受ける(23)。遺伝子型1および遺伝子型3のサイストロン性mRNAは、標準的な同じコザック配列を有するが、遺伝子型3のORF3およびORF2のための関連するAUGコドンは、遺伝子型1のものよりヌクレオチド3個分近くに集まっており、コドン間の距離は、開始の優先度に影響を及ぼすことが公知である。したがって、(遺伝子型内で保存されている)AUG間隔のこの差異が、シカ細胞において遺伝子型1と遺伝子型3の翻訳パターンが異なることを説明する可能性が高い。

10

【0129】

ブタ細胞において、ORF2の差次的翻訳は観察されず、Kernow-C1(遺伝子型3)およびSar-55(遺伝子型1)は、ヒト細胞中であれブタ細胞中であれ、2種のタンパク質を同様の比率で有すると考えられた。しかしながら、力価測定は検出可能なORF2産生に基づいたため、ある種におけるORF2の遺伝子型特異的翻訳が他の種と比べて非効率的であることは、Sar-55の力価がヒト細胞と比べてブタ細胞において一貫して低く、Kernow-C1の場合は逆のことが起こる理由の説明となり得る(図2)。

20

【0130】

受容体の定量的または定性的な差異は、宿主域が異なることに別の説明を与える。HEVに対する特異的受容体は同定されていない。受容体によって決定される宿主域を優先して、6回継代ウイルスは、ヒト細胞において増殖するように適応させたにもかかわらず、ヒト細胞よりもブタ細胞に対して高い力価を維持していた。Sar-55カプシドタンパク質とKernow-C1カプシドタンパク質にはアミノ酸54個の差異(8.2%)があり、糞便カプシドタンパク質と6回継代カプシドタンパク質の差異は5個だけであったことから、適応させたウイルスは、糞便ウイルスの受容体と相互作用する特異性を保持していた可能性があることが示唆された。

30

【0131】

ORF3もまた、宿主域を制限するための重要な候補である。ORF3タンパク質は、おそらくは1つまたは複数の細胞タンパク質との相互作用を介したウイルス放出に必要とされる(13、14)。Sar-55のORF3タンパク質とKernow-C1のORF3タンパク質は17.5%(アミノ酸114個内の20個)が異なるため、Kernow-C1 ORF3は、ウイルスが出て行くのに関与している可能性があるブタ細胞タンパク質と効率的に相互作用することができる場合があるが、Sar-55 ORF3はできず、したがって、Sar-55の複製サイクルは中止されると考えられる。

【0132】

HEVのゲノム間組換えおよびゲノム内組換えは、まれにしか報告されていない(24)。したがって、6回継代ウイルスにおいてヒトRNA配列が獲得されたことはかなり注目すべきことである。この挿入物を有するゲノムは糞便中で検出されたため、挿入物は、細胞培養の人為産物ではない。

40

【0133】

Sar-55のHVRを実験的に短縮することはできたが除去することはできなかったことから、この配列それ自体は不可欠ではないことが示唆された(22)。Pudupakamらによって比較されたHVR(22)は、Kernow-C1のORF1のアミノ酸706~792に対応する。すべての株のHVRおよびORF1のアミノ酸215~957をだいたい含む周囲の領域は、明確な機能を有しておらず、これらはHVRの上流のYドメインおよびパピリン様ドメインならびに下流のプロリンヒンジおよびXドメインと簡便に呼ばれる。したがって、HVR内部の挿入物は、いかなる機能も妨

50

害しないと予想される。HVRは、徹底的に特徴を明らかにされてはいないが、1つの比較(22)から、各遺伝子型内で、特定の配列パターンが保存されている可能性があることが示唆されている。遺伝子型1および遺伝子型3のHVR配列は、この比較において実質的に異なっていた。Kernow-C1糞便コンセンサス配列は、Sar-55の場合の71個と異なり、アミノ酸86個を含む。しかしながら、S17挿入断片が存在する場合に、Kernow-C1と構築されたSar-55キメラの両方に生存能力があることから、この領域が実質的な変化を許容できることが実証された。

【0134】

Takahashiらは、高いHEV力価を有する事実上任意の血清が培養細胞に感染できることを最近示した(25)。RNAウイルスは疑似種として存在し、HEVのための細胞培養システムを開発する際の極めて大きな困難を考慮すれば、力価の高い試料は、培養細胞の感染を可能にするのに必要とされる正確な変異群を有する変種を含む可能性が高いと考えられる。Kernow-C1株がげっ歯動物から霊長類まで及びこのような広範な種に由来する細胞に感染する非凡な能力は、免疫無防備状態の宿主への長期的感染の間に生じた高い力価および複雑な疑似種を反映している可能性が高い。この可能性は、HEVが宿主細胞配列との組換えを通して新しい情報を獲得できるという証明と共に、患者の慢性HEV感染が、この「出現するウイルス」の進化に重要な意味を持っているという結論を導く。したがって、単に患者の幸福のためだけでなく、ウイルスの先々の制御のためにも、HEV感染症を慢性になる前に治癒させることが望ましい場合がある。

【0135】

考察 - 実施例3

HEV研究に関して、本発明者らが構築した感染性の遺伝子型3 cDNAクローンは、さらなる道具を提供する。肝臓はこのウイルスの標的器官であるため、ヒト肝臓(HepG2/C3A)細胞にトランスフェクトまたは感染し、かつ、生存能力があるウイルスを大量に産生する能力は、より信頼できるモデルシステムを提供し得る。このモデルシステムは、興味をそそるデータをもたらしたが関連のない単一のウイルスタンパク質の過剰発現への依存によって限定されている、数多くのうまく実行された研究を再考するためのものである。さらに、p6ウイルスがブタ細胞に感染する能力は、遺伝子型1株および遺伝子型2株の宿主域をヒトおよび非ヒト霊長類に限定するパラメーターを特定するのに有用となり得る。本発明者らが開発したルシフェラーゼレプリコンは、簡便な連続的試料採取を可能にし、非常に感度が高いため、いくつかの研究に特に有用であるはずである。ルシフェラーゼ遺伝子はサブゲノムmRNA上に位置しているため、ルシフェラーゼ産生はサブゲノムRNAの合成および安定性に関する間接的指標の役割を果たすことができる。この新規モデルシステムは、これまで特徴決定されていなかったX遺伝子領域が、その中の3つの変異がトランスフェクション後の感染状態の確立に実質的に寄与したため、ウイルス複製において機能を有しているという最初の証拠を既に提供した(図6および図8)。

【0136】

HEVゲノム中に埋め込まれたヒトS17遺伝子配列の発見は、完全に予想外であった(実施例1)。最初に、ウイルスゲノムが宿主RNAと組み換えていたこと、次に、この事象が、細胞培養中のこの極めて少ない疑似種ウイルスの選択をもたらす特性を与えたように見受けられることをこの発見は示したため、特に意外であった。その後、別の慢性感染患者に由来する遺伝子型3株を用いてこのシナリオが繰り返されたことから(Nguyen et al., in press 2012, J. General Virol.), HEVによる非正統的組換えは必ずしも珍しい事象ではないことが示唆された。本研究において、本発明者らは、この組換えウイルスが、細胞培養における最初の継代後にすぐ出現することを実証した(表5)。その後の継代すべてにおいて優勢であることから、この組換えウイルスが細胞培養適応において決定的に重要な役割を果たすことが強く示唆された。感染性cDNAクローンの変異誘発研究によって、挿入断片が細胞培養における効率的なウイルス増殖を可能にするにあたっての主要因子であることが明確に実証された。段階的なクローニング戦略により、S17挿入断片以外の変異も適応に寄与することが実証された(図5)。したがって、最終構築物からS17挿入断片を除去した

際に点変異によってトランスフェクションの促進がほぼすべて失われることを発見したのは印象的であった(図7)。もっともらしい説明は、挿入されたS17配列がRNAの安定性/翻訳能力を向上させるか、またはORF1タンパク質のフォールディング/プロセッシング/安定性を手助けしたというものである。HEVのタンパク質分解プロセッシングの問題は、まだ解決されていない。しかしながら、S17挿入断片中のヌクレオチド位置の24~32%に同義変異を導入してもトランスフェクションレベルにはっきりと分かるほどの影響を及ぼさなかったため(図9)、ウイルスRNAが重要な因子である見込みは低いと考えられ、むしろ、効果はタンパク質レベルであることが示唆される。Pudupakamらによる欠失実験により、標準HVRのサイズを小さくすると、HEVのビルレンスが低下し得るか、または細胞培養におけるその複製が減少し得ることが示された。S17挿入断片の50%短縮に基づく本発明者らのデータから、挿入断片のサイズ、ゆえにHVRのサイズが重要であることが実証されたが、GFP断片、GTPアーゼ断片、またはS19遺伝子断片(図10A、10B、10D)を置換する実験からは、挿入断片とゲノム背景の両方のアミノ酸組成が促進に寄与することが示唆された。この結論は、遺伝子型1株および遺伝子型3株のHVRを交換した場合にインビトロでの複製が減少したことを示すデータと合致している。

【0137】

ハムスター細胞のような思いもよらない種においてSar55ゲノムが複製する能力をS17配列が増大させるということは、HEV感染症と最近関連付けられた神経学的障害などの新規症候群が、HVRの変化に起因する新規細胞型に感染する能力を反映している可能性があるという1つの推測をもたらす。確かに、この可能性は調査に値する。

【0138】

HEVの組換えは顕著ではなく、遺伝子型間組換えはごくまれにしか示されていない。振り返ってみると、これは、4種のヒト遺伝子型の様々な伝染経路および局所的な地理的分布により、2種またはそれ以上の容易に識別可能なゲノムによる同時感染の数が少なくなることから反映している可能性がある。特に探索しない限り、遺伝子型内組換えに気付かない場合がある。しかしながら、検査したわずか2名の患者に由来するHEVゲノム中に埋め込まれた3種の異なるヒト配列を本発明者らが発見したことから、HEVは理解されているよりも頻繁に組換えを受ける可能性があることが示唆される。これらの特定のリボソームタンパク質遺伝子の挿入が偶然に起こったのか、またはHEV複製の何らかの未知の局面を反映したのかを判定するために、さらなる研究が必要とされている。

【0139】

ヒトHepG2/C3AおよびブタLLC-PK1細胞を用いたトランスフェクション実験および感染実験によって、p6ウイルスが、糞便ウイルス疑似種の種の境界を越える能力を保持し、1つの事例においてのみ、ブタ細胞における力価の方が高いことが統計学的に有意であったものの、ブタ細胞に対する好みを示すことが実証された。一方、糞便接種材料の力価は、ヒト細胞と比べてブタ細胞において最高で13倍高いことが以前に報告されていた。このことから、ブタ細胞への感染に有利である変異、またはヒト細胞への感染に不利益な変異のいずれかを有している糞便疑似種の他のメンバーが存在する可能性が示唆される(図13)。受容体または他の因子が宿主域を決定するかは知られていない。クローン化されたp6ウイルスと糞便中のウイルスのコンセンサス配列とでは、カプシドタンパク質中の4つのアミノ酸(AA)が異なり、これが受容体相互作用に影響を及ぼす可能性がある。HepG2/C3A細胞に対する最初の選択段階に相当するp1ウイルスクローン中にも、4つの変異の内の2つが存在したため、これらの変異のいずれかを糞便中のコンセンサス配列に復帰させるとブタ細胞における相対的力価が増大するかを確認することは興味深い。

【0140】

p6ウイルスおよびORF3ヌルウイルスの両方とも最終的には培養物中のHepG2/C3A細胞の大多数に伝播し、感染したものの、比較的ゆっくりとそれは起こり、感染細胞の比率は、7日目を過ぎるまで増加し始めなかった(図11)。一方、ルシフェラーゼ発現は、トランスフェクション後1日目にすぐに培地中で検出され(2163単位)、2日目までに38倍に急増した(図8A)。ルシフェラーゼはサブゲノムmRNAから翻訳されるため、ウイルスのマイナス鎖お

10

20

30

40

50

よびサブゲノムRNAの合成はこの実験において0日目～2日目の間に最大であったはずであることから、ウイルスRNAおよび/またはタンパク質の合成はおそらくは律速ではなく、むしろ、組立、成熟、および/または分泌が、感染性HEVビリオンの比較的ゆっくりとした産生の原因であることが示唆される。ルシフェラーゼ構築物はカプシド遺伝子を欠くため伝播できないことは注目に値し、したがって、図8Cのデータから、p6のサブゲノムmRNAの翻訳が、低下する前の7日目または8日目まで最高速度で続くことが示唆された。

【0141】

おそらく、最も混乱させる結果は、ORF3タンパク質を作ることができないウイルスが、ORF3タンパク質を合成するものと同じくらい効率的に培養物の至る所に伝播するという発見であった。この結果は、答えよりも多くの疑問を提起する。比感染力の差異が観察されたことは、なぜそれが起こったかに関する説明を与えるが、なぜ比感染力が異なるかという疑問は残っている。

10

【0142】

材料および方法

供給源の患者

少なくとも2年間、HEVに慢性的に同時感染しているHIV-1感染48歳男性の糞便から、HEV粒子を精製した(5)。診断時に、この患者は、活性な炎症性成分を伴う肝硬変を確立していた。さらに、彼は末梢神経障害の臨床的特徴も有していた。HEVは彼のCSF中で検出され、症状はウイルス排除と共に消えたため、これはHEVに関連した合併症であるように感じられた。この患者から得られたウイルス株をKernow-C1 HEVと呼んだ(26)。

20

【0143】

細胞培養

Huh-7ヒト肝癌細胞は、日本で最初に単離された(Nakabayashi et al, 1982)。S10-3細胞、Huh-7細胞およびC25j細胞のサブクローン、Caco-2細胞のサブクローン(HTB-37)のいずれも、施設内で単離された。他の細胞株はすべて、American Type Culture Collectionから購入し、追加の方法(Supplementary Methods)において説明している。2mM L-グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン(Sigma, St. Louis, MO)、および10%ウシ胎児血清(C25jの場合は20%)(Bio-Whittaker, Walkersville, MD)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(cellgro, Mediatech, Manassas, Va)中で、大半の細胞株を増殖させた。シカ肝臓細胞およびニワトリ肝臓細胞を、20%ウシ胎児血清(Bio-Whittaker, Walkersville, MD)を添加したOpti-MEM(Gibco)中で培養した。HepG2/C3A細胞、C25j細胞、シカ細胞、およびニワトリ細胞を、ラット尾コラーゲン1型(Millipore)上で増殖させた。すべての細胞ストックを5%CO₂の存在下、37℃で増殖させた。

30

【0144】

ウイルスストック

6回継代ウイルス以外のウイルスストックはすべて、PBS中10%糞便懸濁液(pH7.4)からなった。RT-PCR力価は、10⁶～10⁸ゲノム当量/100uLの範囲であり、感染価の予測に役立たなかった。遺伝子型1株のSar-55(GenBank M80581.1)およびAkluj(GenBank AF107909)を、パキスタンおよびインドの患者からそれぞれ単離した。遺伝子型3のUS-2株(Genbank AF060669)を米国の患者から取得し、アカゲザルにおいて増幅させた。遺伝子型3のKernow-C1(「Cornwall(コーンウォール)」の古くからのコーンウォール語)株を、前述したとおりにHIVに同時感染した慢性感染E型肝炎患者から得た。6回継代ウイルスは、連続継代によってHepG2/C3A細胞中で増殖するように適応させたKernow-C1糞便ウイルスである。

40

【0145】

プラスミド構築物

HEV株Sar-55、pSK-E2(Genbankアクセッション番号AF444002)、およびプラスミドCMV-Sarの感染性cDNAクローンは以前に説明されていた(16、27)。プラスミドCMV-SarにおいてSar-55サブゲノムRNAの最初の29個のヌクレオチドをKernow-C1 HEVのヌクレオチドで置換することによって、プラスミドCMV-MT29を作製した。糞便中のKernow-C1ウイルスのバイシストロン性mRNA全体を増幅させ、Sar-55に対してしたとおりにそれをpCMV5122中にクロー

50

ニングすることによって、プラスミドCMV-Kernowを構築した(16)。6回継代Kernow-C1ウイルスからヒトS17遺伝子を増幅させ、pSK-E2のHVR領域内のヌクレオチド2251番と2252番の間に融合PCRによってインフレームにそれを挿入することによって、センスの向き(Sar55-S17)、逆向き(Sar55-S17R)、および逆相補的な向き(Sar55-S17RC)でヒトS17遺伝子配列を含むSar-55 cDNAクローンを構築した。pSK-E2中のSar-55バイシストロン性領域の最初の29個のヌクレオチドをKernow-C1のヌクレオチドで置換することによって、感染性プラスミドpSK-E2-MT29を作製した。

【0146】

培養細胞のインピトロでの転写およびトランスフェクション

以前に説明され(27)、追加の方法で詳述されるとおりに、T7ポリメラーゼを用いて完全長ウイルスcDNAを転写し、DMRIE-C(Invitrogen)を用いて、キャッピングされた転写物をS10-3細胞またはシカ細胞にトランスフェクトした。試したトランスフェクション方法のどれによっても、LLC-PK1細胞は死滅した。追加の方法で説明するとおりに、Lipofectamine 2000(Invitrogen)を用いて、S10-3細胞およびシカ細胞にCMVプラスミドをトランスフェクトした。

10

【0147】

培養細胞の感染

感染の1日前に、8ウェルのLab-Tek(商標)II-CC²(商標)スライド(Nunc)に100,000細胞/ウェルを播種した。Opti-MEM(Gibco)でウイルスストックを希釈し、希釈したウイルス100 μLを各チャンバーに添加し、CO₂インキュベーター中、34.5 °Cで5時間インキュベートした。ウイルス混合物を除去し、細胞をPBSで洗浄し、培地を添加し、続いて、34.5 °Cで3日間インキュベートした。

20

【0148】

免疫蛍光解析およびフォーカス形成アッセイ法

8ウェルのチャンバースライド上の細胞をアセトンで固定し、チンパンジー抗ORF2およびウサギ抗ORF3で二重染色した。以前に説明され(28)、かつ追加の方法で説明するとおりに、蛍光顕微鏡を用いて、染色された細胞またはフォーカスを可視化し、手作業で計数した。

【0149】

ORF2タンパク質およびORF3タンパク質を定量するためのフローサイトメトリー解析

100mmシャーレ(Corning)中で培養されたトランスフェクトされた細胞をトリプシン処理し、4 °Cで15分間、1mLメタノールで固定した。免疫染色は、別々の細胞分取物をORF2タンパク質およびORF3タンパク質について染色したこと以外は、接着細胞の場合と同じであった。PBSで洗浄した後、PBS 1mL中に細胞を再懸濁し、FACSscanフローサイトメーター(Becton Dickinson)を用いて解析した。各試料について合計20,000個の事象を獲得し、BD Cell Quest(商標)ソフトウェアを用いてデータを解析した。

30

【0150】

RT-PCR

トリゾールLS(Invitrogen)を用いてRNAを抽出し、逆転写し、Qiagenキットを用いて増幅させた。アガロースゲルから溶出させたPCR産物を、直接配列決定して糞便および6回継代のコンセンサス配列を提供するか、またはクローニングし、次いで配列決定して、代表的なHVR配列を提供した。詳細については追加の方法を参照されたい。

40

【0151】

増殖曲線

HepG2/C3A細胞10⁶個を播種したT25フラスコに、HepG2/C3A細胞に対してほぼ等しいFFUを含むように希釈した、前もって力価測定した糞便ウイルスストックまたは6回継代ウイルスストックを1mL接種した。実験の最後に再度力価測定するために、希釈した各接種材料の分取物を-80 °Cで凍結した。37 °Cで5時間インキュベーションした後、培地を除去し、Optimemで細胞を3回洗浄し、10%ウシ胎児血清を含むDMEM 2.5mLおよび抗生物質を添加し、フラスコを37 °Cでインキュベートした。培地を回収し、指定した日に新鮮な培地に交換

50

した。回収した培地に0.45 μmフィルターを通過させ、100uL分取物として-80 で凍結した。接種材料を含むすべての凍結試料の三通りを同時に処理して、同一条件下でFFUおよびRNA濃度を測定した。同じ試験での直接比較により、6回継代ウイルスの4,200FFUと比べて、糞便接種材料は22,000FFUを含むことが示された。7日目以降、これらの値に対してウイルコクソン検定を実施した。

【 0 1 5 2 】

統計学

米国立アレルギー感染症研究所(National Institute of Allergy and Infectious Diseases)の生物統計学研究部門(Biostatistics Research Branch)の数理統計学者によって統計学的研究が行われた。増殖曲線解析以外のすべてに対してスチューデントのt検定を使用した。

10

【 0 1 5 3 】

追加の材料および方法

細胞。American Type Culture Collectionから購入した細胞株は、ヒト肝癌HepG2/C3A(CRL-10741)およびPLC/PRF/5(CRL-8024)、ヒト肺癌A549(CCL-185)、シカ肝臓OHH1.Li(CRL-6194)、ブタ腎臓LLC-PK1(CL-101)、LLC-PK1A(CL-101.1)、およびSK-RST(CRL-2842)、イヌ腎臓MDCK(CCL-34)、ネコ腎臓CRFK(CCL-94)、ウサギ腎臓LLC-RK1(CCL-106)、ニワトリ肝臓LMH(CRL-2117)、ならびにマウス肝臓Hepa1-6(CRL-1830)であった。

【 0 1 5 4 】

培養細胞のインビトロでの転写およびトランスフェクション。E型肝炎ウイルス(HEV)のポリ(A)テールの下流に位置するBglIII部位において、プラスミドpSK-E2を直鎖状にした。以前に説明されたとおりに、T7 Riboprobeインビトロ転写システム(Promega)およびアンチリバースキャップアナログ(Anti-Reverse Cap Analog)(Ambion)を用いて(Emerson, 2001, 前記)、キャッピングされたRNA転写物を生じさせた。S10-3細胞またはC25j細胞のトランスフェクションのために、RNA転写混合物40 μL、Opti-MEM(Gibco)1mL、およびDMRIE-C(Invitrogen)16 μLを混合し、6ウェルプレートの1つのウェルに添加した。これらの細胞株は高いRNAトランスフェクション比率が理由で選んだ:C25j細胞は最も高いレベルで感染性ウイルスを産生したが、それらは細胞内に残り、細胞溶解によって回収されなければならなかった。シカ細胞のトランスフェクションのために、RNeasyキット(Qiagen)を製造業者のプロトコールに従って用いて、インビトロで転写されたRNAを精製した。精製されたRNA(2.5 μg)をOpti-MEM(Gibco)500 μL中で希釈し、Opti-MEM(Gibco)500 μLおよびLipofectamine 2000(Invitrogen)5 μLを含む混合物に一滴ずつ添加し、室温で20分間インキュベートし、6ウェルプレートの1つのウェルに添加した。CO₂インキュベーターにおいて34.5 で5時間、トランスフェクション混合物と共にインキュベーションした後、トランスフェクション混合物を培地に交換し、インキュベーションを34.5 で継続した。試したトランスフェクション方法のどれによっても、LLC-PK1細胞は死滅した。プラスミドDNAトランスフェクションのために、S10-3細胞および/またはシカ細胞を6ウェルプレートで増殖させ、前述したとおりにLipofectamine 2000(Invitrogen)を用いてDNA 2 μgをトランスフェクトした。CO₂インキュベーターにおいて37 で6時間、S10-3細胞および/またはシカ細胞のDNAトランスフェクションを実施した。トランスフェクション混合物を培地に交換した後、インキュベーションを37 で継続した。

20

30

40

【 0 1 5 5 】

エレクトロポレーション。HepG2/C3A細胞およびLLC-PK1細胞はDMRIE-Cによって死滅した。したがって、240ボルトおよび950キャパシタンスの設定のBioRad Gene Pulser IIならびにBioRadキュベット165-2086番を用いたエレクトロポレーションによってこれらをトランスフェクトした。100ulの転写混合物から得られたRNA転写物をTRIzol LS(Invitrogen)を用いて抽出し、イソプロパノールを用いて沈殿させ、75%エタノールで洗浄し、水50ul中に再懸濁させた。100mmシャーレ内のコンフルエントな単層中の細胞をトリプシン/EDTAを用いて剥離し、等体積のPBS中1%結晶性ウシ血清アルブミンと混合し、1600RPM、40Cで5分間、沈殿させた。Optimum 400uL中に細胞を再懸濁し、RNAと混合し、電気パルス

50

与え(pulsed)、20%ウシ胎児血清を含む培地に添加した。プレートまたはフラスコに細胞を入れ、370C(HepG2/C3A)または34.50Cで一晩インキュベートした。増殖を促進するのに十分な密度の培養物を提供するために、T25フラスコ中のエレクトロポレーションされたHepG2/C3A細胞に、T25フラスコから得た未処理細胞の4分の1を補充した。翌朝、10%血清を含む新鮮な培地で培地を交換し、インキュベーションを継続した。

【0156】

免疫蛍光解析およびフォーカス形成アッセイ法。チャンバースライド上のトランスフェクトされた細胞または感染細胞をPBSで洗浄し、アセトンで固定し透過処理した。HEV感染チンパンジー(Ch1313)由来のHEV ORF2特異的高度免疫血漿(Emerson, 2004, 前記)とウサギ抗ORF3ペプチド抗体(Emerson, 2004, 前記)の混合物と共に室温で45分間、固定された細胞をインキュベートすることによって、ORF2タンパク質およびORF3タンパク質を検出した。(チンパンジー血漿は、バックグラウンド染色を最小限にするために、各細胞株に前もって吸着させた)。PBSで洗浄した後、Alexa Fluor 488ヤギ抗ヒトIgG(Molecular Probes)とAlexa Fluor 568ヤギ抗ウサギIgG(Molecular Probes)の混合物と共に室温で30分間、細胞をインキュベートした。PBSで洗浄した後、DAPIを含むVectashield封入剤(Vector Laboratories)を添加し、Zeiss Axioscope 2 Plus蛍光顕微鏡を用いて40倍の倍率で細胞を可視化した。陽性の細胞またはフォーカスを手作業で数えた。

【0157】

野生型cDNAクローンおよび変異体cDNAクローンによるS10-3細胞およびシカ細胞のトランスフェクション。トランスフェクションの1日前に、S10-3細胞およびシカ細胞を6ウェルプレートに播種し、約70~80%のコンフルエンスの時点でトランスフェクトした。各プレートの3個のウェルを、Sar-55の野生型感染性cDNA(pSKE2)で、またはpSK-E2バイシストロン性領域の最初の29個のヌクレオチドをKernow-C1のヌクレオチドで置換した変異体(pSK-E2-MT29)で、トランスフェクトした。トランスフェクトされたS10-3細胞中のHEVタンパク質をFACS解析するために、各ウェルの細胞をトリプシン処理し、別々のチューブに移した。ORF2タンパク質およびORF3タンパク質の免疫染色ならびにFACS解析は、材料および方法の箇所で説明したとおりに実施した。5日目にシカ細胞を免疫染色するために、各ウェル中の細胞を4日目にトリプシン処理し、8ウェルのチャンパー付きスライドの別々のウェルに記号化して移し、5日目に免疫染色した。記号を明らかにする前に、ORF2について染色された細胞およびORF3について染色された細胞のすべてを手作業で数えた。

【0158】

RT-PCR。TRIzol LS(Invitrogen)を用いてRNAを抽出した。糞便ウイルスおよび6回継代ウイルスのコンセンサス配列の場合、SuperScript II RNase H-逆転写酵素(Invitrogen)を用いてRNAを逆転写し、通常はQiagen LongRange PCRキットを用いて増幅させた。Cの多いやっかいな領域は、Qiagen LongRange 2Step RT-PCRキットを用いて増幅させた。生成物をアガロースゲル上で電気泳動させ、溶出させ、直接配列決定した。Qiagen LongRange 2 Step RT-PCRキットを用いたネステッドRT-PCRによって、超可変領域(HVR)を増幅させた。174塩基の挿入断片を検出するための4つのプライマーセットの各ペアは、HEV配列に一致する1つのプライマーおよび挿入断片配列に一致する1つのプライマーを含んだ。電気泳動後、生成物を直接配列決定した。HVR全体を増幅させるためのネステッドプライマーセットは、HVRのどちらかの側のHEV配列と一致した。目に見える生成物ならびにそのすぐ上およびすぐ下の領域をアガロースゲルから溶出させ、Zero Blunt TOPO PCRクローニングキット(Invitrogen)を用いてクローニングし、120個の個別のコロニーを配列決定した。培地中のRNAゲノムをリアルタイムRT-PCR(TaqMan)によって定量した。

【0159】

前述の本発明は、理解をはっきりさせるために、例証および例としていくらか詳しく説明されたが、添付の特許請求の範囲の精神からも範囲からも逸脱することなく、いくつかの変更および修正をそれに加えてよいことは、本発明の教示に照らして当業者には容易に明らかになるであろう。

【0160】

本明細書において引用した刊行物、アクセション番号、特許、および特許出願はすべて、あたかもそれぞれが参照により組み入れられることが具体的かつ個別に示されたかのように、参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 1 6 1 】

補足的参照文献

1. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS (2004) Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 85:240-244
2. Boccia D, et al. (2006) High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. *Clin Infect Dis* 42:1679-1684 10
3. Meng XJ (2010) Recent advances in Hepatitis E virus *J Viral Hepat* 17:153-161
4. Peron JM, et al. (2006) Prolonged hepatitis E in an immunocompromised patient. *J Gastroenterol Hepatol* 21:1223-1224
5. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S (2009) Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 361:1025-1027 20
6. Legrand-Abrevanel F, et al. (2010) Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis* 202:835-844
7. Pischke S, Wedemeyer H (2010) Chronic hepatitis E in liver transplant recipients: a significant clinical problem? *Minerva Gastroenterol Dietol* 56:121-128
8. Kc S, Sharma D, Basnet BK, Mishra AK (2009) Effect of acute hepatitis E infection in patients with liver cirrhosis. *JNMA J Nepal Med Assoc* 48:226-229 30
9. Dalton HR, et al. (2007) The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* 26:1429-1435
10. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S (2003) Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362:371-373
11. Purcell RH, Emerson SU (2008) Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 48:494-503 40
12. Purcell RH, Emerson SU (2010) Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. *J Infect Dis* 202:819-821

13. Yamada K, et al. (2009) ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 90:1880-1891
14. Emerson SU, et al. (2010) Release of genotype 1 hepatitis E virus from cultured hepatoma and polarized intestinal cells depends on open reading frame 3 protein and requires an intact PXXP motif. *J Virol* 84:9059-9069.
15. Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S (2008) Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci* 33:451-464 10
16. Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU (2006) A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 80:5919-5926
17. Emerson SU, Anderson D, Arankalle A, Meng XJ, Prudy M, Schlauder GG and Tsarev SA. (2004) *Hepevirus*. In: *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball, eds), 851-855. Elsevier/Academic Press, London 20
18. Pavio N, Meng XJ, Renou C (2010) Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res* 41:46
19. Yamada K, et al. (2009) Construction of an infectious cDNA clone of hepatitis E virus strain JE03-1760F that can propagate efficiently in cultured cells. *J Gen Virol* 90:457-462
20. Tanaka T, et al. (2009) Development and characterization of a genotype 4 hepatitis E virus cell culture system using a HE-JF5/15F strain recovered from a fulminant hepatitis patient. *J Clin Microbiol* 47:1906-1910 30
21. Graff J, et al. (2005) In vitro and in vivo mutational analysis of the 3'-terminal regions of hepatitis E virus genomes and replicons. *J Virol* 79:1017-1026
22. Pudupakam RS, et al. (2009) Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo. *J Virol* 83:384-395 40
23. Kozak M (1995) Adherence to the first AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2662-2666
24. Wang H, et al. (2010) Recombination analysis reveals a double recombination event in hepatitis E virus. *Virol J* 7:129

25. Takahashi M, et al. (2010) Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol* 48:1112-1125
26. Dalton HR, et al. (2010) Neurological sequelae of acute and chronic HEV genotype 3 infection. *Gut* 59: suppl II A36
27. Emerson SU, et al. (2001) Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15270-15275 10
28. Emerson SU, et al. (2004) In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol* 78:4838-4846
29. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982) Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42:3858-3863 20

【 0 1 6 2 】

(表1) 野生型cDNAクローンおよび変異体cDNAクローンの感染性転写物をトランスフェクトされたシカ細胞におけるORF2タンパク質およびORF3タンパク質の産生

		pSK-E2 ²			pSK-E2-MT29 ³			
実験番号 ¹	ORF2 ⁴	ORF3 ⁴	ORF3/ORF2	実験番号 ¹	ORF2 ⁴	ORF3 ⁴	ORF3/ORF2	
1	149	510	3.42	4	43	19	0.44	
2	146	420	2.88	5	56	24	0.43	
3	74	351	4.74	6	28	9	0.32	

- 各ウイルスゲノムを3つの培養物にトランスフェクトした。
- HEV株Sar-55の感染性cDNAクローン。
- pSK-E2のSar-55バイシストロン性領域の最初の29個のヌクレオチドをKernow-C1のもので置換した、HEVの感染性cDNAクローン。
- トランスフェクトされた細胞を記号化して8ウェルのチャンバースライドに移し、5日目に免疫染色し、記号を解読する前に各ウェル中のORF2陽性細胞およびORF3陽性細胞をすべて数えた。 40

【 0 1 6 3 】

(表2) 野生型cDNAクローンおよび変異体cDNAクローンの感染性転写物のトランスフェクション後のS10-3細胞中のORF2タンパク質およびORF3タンパク質のFACS解析

pSK-E2 ²				pSK-E2-MT29 ³			
実験 番号 ¹	ORF2 ⁴	ORF3 ⁴	ORF3/ORF2	実験 番号 ¹	ORF2 ⁴	ORF3 ⁴	ORF3/ORF2
1	22.45% ⁵	37.73%	1.68	4	21.97%	29.07%	1.32
2	23.16%	38.84%	1.67	5	22.21%	26.96%	1.21
3	19.78%	39.70%	2.00	6	21.67%	31.71%	1.46

10

5. 各ウイルスゲノムを3つの培養物にトランスフェクトした。

6. HEV株Sar-55の感染性cDNAクローン。

7. pSK-E2のSar-55バイシストロン性領域の最初の29個のヌクレオチドをKernow-C1のもので置換した、HEVの感染性cDNAクローン。

8. トランスフェクション後5日目に、ORF2タンパク質およびORF3タンパク質について細胞を免疫染色した。

9. 示されたウイルスタンパク質について染色された細胞の比率(%)。

【 0 1 6 4 】

(表3) HepG2/C3A細胞およびLLC-PK1細胞における遺伝子型1のHEVおよび遺伝子型3のHEVの力価¹

20

実験	HepG2/C3A細胞におけるウイルス力価 ²						LLC-PK1細胞におけるウイルス力価 ²						LLC-PK1/HepG2/C3A ³					
	Sar-55 ⁴	Aktuj	US-2	糞便 Kernow-CI ⁵	6回継代 Kernow-CI		Sar-55 ⁴	Aktuj	US-2	糞便 Kernow-CI ⁵	6回継代 Kernow-CI		Sar-55 ⁴	Aktuj	US-2	糞便 Kernow-CI ⁵	6回継代 Kernow-CI	
実験 1	98,800	99,000	1,200	460,000	6		13,000	11,400	315	1,120,000	-		0.18	0.13	0.64	1.60	-	
	85,000	81,000	400	560,000	-		20,200	10,900	500	830,000	-							
	78,000	80,000	560	710,000	-		12,900	11,600	560	770,000	-							
実験 2	-	-	250	230,000	-		-	-	2,100	1,040,000	-							
	-	-	180	240,000	-		-	-	1,800	1,090,000	-			9.03		4.10	-	
	-	-	190	260,000	-		-	-	1,700	860,000	-							
実験 3 ⁷	19,000	4,800	15	4,000	1,500		64,000	530	330	40,000	6,400							
	19,000	3,800	25	2,000	1,100		6,700	450	390	53,000	5,300		0.30	0.12	15.60	13.09	5.49	
	25,000	3,700	35	5,000	900		5,700	490	450	51,000	7,500							
実験 4	69,400	-	-	-	6,100		24,000	-	-	-	15,000							
	70,000	-	-	-	5,400		20,000	-	-	-	19,000		0.31	-	-	-	2.84	
	61,000	-	-	-	8,200		22,000	-	-	-	22,000							

(表4) 糞便中のウイルスのコンセンサス配列とHepG2/C3A細胞において6回継代されたものとの比較¹

ゲノムの領域	ヌクレオチド		アミノ酸		
	位置 ²	糞便/p6	位置 ²	糞便/p6	
未分類	1975	G/C ³	650	Gly/Ala ³	
HVR ⁴	2236	U/C	737	Val/Ala	
HVR	2275	挿入断片 174 nt	750	(挿入断片 58 aa)	10
HVR	2329	A/G	768	Asn/Ser	
HVR	2334	A/G	770	Ile/Val	
HVR	2341	U/C	772	Leu/Ser	
HVR	2346	C/U	774	Pro/Ser	
Xドメイン	2562, 2563	U/C, G/C	846	Trp/Ser	
Xドメイン	2899	A/G	958	Asn/Ser	
ヘリカーゼ	3029	A/U	1001	Gln/His	20
ポリメラーゼ	4401	U/C	1459	Phe/Leu	
カプシド	5191	C/U	2	Arg/Cys	
カプシド	5383	G/A	66	Val/Ile	
ORF3			69	Met/Ile	
カプシド	6634	A/G	483	Thr/Ala	
カプシド	7142	U/C	652	Met/Ser	
カプシド	7144	A/G	653	Lys/Glu	
3' NC ⁵	7181	U/C	-	-	30
3' NC	7207	C/U	-	-	
3' NC	7208	U/G	-	-	
3' NC	7231	C/U	-	-	

1. 記載なし:44個のサイレント変異が散在し、44個の内の37個はU/CまたはC/Uである。

2. 糞便ウイルスの配列に基づいた位置;挿入断片には番号を付けていない

3. 糞便ウイルス中のヌクレオチドまたはアミノ酸、続いて6回継代ウイルス中のヌクレオチドまたはアミノ酸

4. 超可変領域

5. 3'非コード領域

【 0 1 6 6 】

(表5) 各継代レベルに由来するHVRクローンの比較

クローンの数

継代数(クローンの数)	S17 ¹	GTPアーゼ ²	欠失(ヌクレオチド数) ³
1 (11)	2	5	1 (171) ⁴ ; 1 (612; 2 (501)
2 (10)	9	0	1 (738)
3 (8)	8	0	0
4 (10)	8	0	2 (435) ⁵
5 (8)	8	0	0
6 (11)	10	0	1 (381)

10

¹58個のアミノ酸をコードするS17挿入断片を有するクローンの数

²114ntのGTPアーゼを含むがS17を欠くクローンの数

³S17挿入断片を含む6回継代物と比べた欠失

⁴欠失およびS17挿入断片がない

⁵S17の3'の45ntを除去する欠失を有する2つの同一クローン

【 0 1 6 7 】

(表6) 6回継代ウイルスと断片を交換することによる、1回継代Kernowウイルスの段階的改変

名称	追加されたp6配列	追加された変異
p1	なし+1回継代cDNAクローン	なし
p1/S17	S17 挿入断片	Aa751-807 ¹
6812-An	SnaB1-MluI [6812-ポリア]	aa593-594[TL/AS] ² 652-653[MK/TE] nt7355-6[tt/cc] 7381[c/t] 7405[c/t] 7407[t/c] [A ₃₆ /A ₈₅] ³
4608-6812	Nsi1-SnaB1 [4608-6812]	aa483[T/A]; ORF3:aa1[M/T] 69[M/I]
671-2182	AsiS1-Not1 [671-2182]	aa220[A/T] 598[R/C] 650[G/A]
2182-3063	Not1-BsiW1 [2182-3063]	aa838[P/-] 882[L/P] 904[S/P] 965[R/Q] Nt2520-2534 [ccc/ccca 4X]
3063-4608	BsiW1-Nsi1 [3063-4608]	アミノ酸変化なし
p6	Nsi1-Pml1 [4608-5743]	ORF3:aa1[T/M]

20

30

¹括弧は変異を示す [1回継代/6回継代]: 大文字=アミノ酸、小文字=ヌクレオチド

²下線は、ORF2中のアミノ酸変異を示す

³ポリアデノシン鎖の長さ

【 0 1 6 8 】

(表7) 糞便ウイルスのコンセンサス配列と継代ウイルスのコンセンサス配列との比較

1

ORF1	糞便 コンセンサス	p1 クローン	P6 クローン	6回継代 コンセンサス
	yTy 220 ²	A ³	T	T
	sRq 598	R	C	R
	cGa 650	G	A	A
	pVs 737	V	A	A
	vSd 738	G	S	S
	pNp 668	N	S	S
	pIv 770	I	V	V
	vLp 772	L	S	S
	pS/Pp 774 ⁴	P	S	S
	pPp 777	L	P	P
	pPp 779	S	P	P
	pST 785-6	FK	ST	ST
	pPS 789-90	SA	PS	PS
	nPg 824	L	P	P
	yWt 846	S	P	P
	yQv 907	R	Q	Q
	aNl 958	S	S	S
	iQq 1001	Q	Q	Q/H
	vFa1459	L	L	L
ORF2				
	mRc 2	C	C	C
	dVv 66	V	I	I
	qTt 483	T	A	A
	pTS 593-4	TL	AS	TS
	kMK 652-3	MK	TE	TE
ORF3				
	pMs 69	M	I	I
	vI/Ts 93	T	T	T

10

20

¹S17挿入断片を有していない糞便ウイルス[GenBank HQ389543]を基準とした番号付け。

²点変異を大文字で、隣接したアミノ酸を小文字で記載している。番号は、大文字のアミノ酸のアミノ酸位置を示す。

30

³各ウイルスの列の文字は、その位置に存在するアミノ酸を示す。

⁴斜線は混合物を示す。

【 0 1 6 9 】

配列表

SEQ ID NO: 1 HEV Kernow遺伝子型3の複製する変種

1 ggcagaccac gtatgtggtc gatgccatgg aggcccacca gttoattaag gtccttggca
 61 ttactactgc cattgagcag gctgctctgg ctgoggocaa ttccgccttg gcgaatgctg
 121 tgggtggttcg gccgttttta tcccgtctac aaaccgagat tcttatcaat ttgatgcaac
 181 cccggcagtt ggttttccgc cctgaagtgc tttggaatca tcctatccag cgggttatac
 241 acaatgaact agaacagtac tgccggggccc gtgctggccg ctgtttgag gtcggagccc
 301 atccgagatc tattaatgat aaccccacg tcttgaccg gtgtttcctt agaccggtg
 361 gcagggatgt tcagcgtcg tactctgccc ccaccgctgg cctgcccggc aattgccgcc 10
 421 gctccgcgct gcgtggcctc cccccgctg accgcacctc ctgttttgat ggattctccc
 481 gttgtgcttt tgctgcagag accggtgtgg ccctttactc tttgcatgac ctttggccag
 541 ctgatgttgc agagggcagtg gcccgctcatg ggatgacacg gttgtatgcc gcactacatc
 601 ttccccctga ggtgctgcta ccaccggca cctatcacac aacttcgtat ctccctgattc
 661 acgacggcga tcgcccgtt gtaacctatg agggcgatac cagtgcgggc tataaccatg
 721 atgtttccat acttcgtgcg tggatccgta ctactaaaat agttggtgac caccgctgg 20
 781 ttatagagcg tgtgcccggcc attggttgc atttcgtgct gttgctcacc gcccctctg
 841 agccgtcacc tatgccttat gtcccctacc ctggttcaac ggaggtgat gttcggctca
 901 tttttggccc tggcggctct ccatctttgt ttccgctcagc ctgctctact aatctacct
 961 tccacgctgt cccggtccat atctgggac ggctcatgct ctttgggtgcc accctggatg
 1021 atcagggcgt ctgtttgtca cgactcatga cttacctccg tggatttagc tacaaggctca
 1081 ctgttgggtgc gcttgttgc aatgaggggt ggaacgcctc tgaagatgct cttactgcag
 1141 tgatcactgc ggcttatctg actatctgcc atcagcgtc cctccgtacc caggcgatat 30
 1201 ccaagggcat gcgcccgttg gaggttgagc atgcccagaa atttatcaca agactctaca
 1261 gttggctatt tgagaagtct ggcgctgatt acatccccgg ccgccagctc cagttttatg
 1321 cacagtgccg acggtggcta tctgcaggat tccatctgga cccaggggtg cttgtttttg
 1381 atgaatcagt gccatgctgt tgtaggacgt tcctgaagaa agtcgcccgt aaattctgct
 1441 gttttatgcg gtggttaggg caggagtgc cctgcttctt ggagccagcc gagggtttag
 1501 ttggcgacca tggccatgac aatgaggctt atgaaggttc tgaggctcagc caggctgaac
 1561 ctgccatct tgatgtttcg gggacttatg ccgtccacgg gcaccagctt gtagccctct 40
 1621 atagggcact taatgtccca catgatattg ccgctcagac ttcccgatta acggctactg
 1681 ttgagcttgt tgcaggtcca gaccgcttgg agtgccgcac tgtgctcggg aataagacct
 1741 tccggacgac ggtggttgat ggcgcccctc ttgaagcgaa tggcccagag cagtatgtcc
 1801 tgtcatttga cgcctcccgt cagtctatgg gggcccgggtc gcacaacctc acttatgagc

1861 tcaccctgc cggtttgag gttaggatct catctaacgg tctggattgc actgctacat
 1921 tcccccccg cggtgccct agcgccgcg caggggaggt ggcagccttc tgtgctgccc
 1981 ttacagata taacaggctc acccagcggc actcgctgac cggtggaacta tggttacacc
 2041 ctgagggatt gctgggtatc ttccctccat tctcccctgg gcatactctg gagtctgcta
 2101 accccttttg cggggagggg actttgtata cccggacctg gtcaacatct ggcttttcta
 2161 gtgattttct tccccctgag gcgcccgccc ctgcttcggc tgctgccccg gggctgcccc
 2221 accctacccc gctgctagt gatatttggg cgttaccacc gccctccgag gagtgctaca
 2281 cgcgcctggg caacgacttc cacacgaaca agcgcggtg cgaggagatc gccattatcc
 2341 ctagcaaaaa gccccgcaac aagatggcag gttatgtcac gcatctgatg aagcgaattc
 2401 agagaggccc agtaagagg atctccatca agctgcagga ggaggctcag gtcgatgcag
 2461 catctgtgcc ccttaccctc gtgcctgctg ggtcgcccag cctgtttgtg tcacctccc
 2521 ccccccccc tccccctgag cgtaaagccat caacaccccc gccttctcgt acccgtcggc
 2581 tcctctacac ctaccccgac ggcgctaagg tgtatgcagg gtcattgttt gaatcagact
 2641 gtgattggct ggttaacgoc tcaaaccogg gccatcgccc tggagggtggc ctctgtcatg
 2701 cctttcatca acgttttccg gaggcgtttt atccgactga attcattatg cgtgagggcc
 2761 tagcggcata caccctgacc ccgcgccta tcatccacgc agtggcgccc gactacaggg
 2821 ttgagcagaa cccgaagagg ctcgaggcag cgtaccggga aacttgctcc cgtcgtggca
 2881 ccgctgctta ccgctttta ggctcgggca tataccaggc cctgtcagc ctgagttttg
 2941 atgcctggga acgcaatcat cgcgccggcg atgagcttta cttgactgag ccgctgccc
 3001 cttggtttga ggctaataag cggcgcagc cggcgttac cataactgag gatacggctc
 3061 gtacggccag cctggcatta gagatcgacg ccgctacaga ggttgccgt gcttgtgccc
 3121 gctgcaactat cagtcctggg attgtgcaact atcagtttac cgtggggctc ccgggctcgg
 3181 gcaagtcaag gtccatacaw cagggagatg ttgatgtggt ggttgtgccc acccgggagc
 3241 tccgtaacag ttggcgccgc cggggtttcg cggctttcac acctcacaca gggcccctg
 3301 ttactaacgg ccgcccgtt gtgattgatg aggccccatc tctcccgcca cacctgttgc
 3361 tgctacatat gcagcgggccc tctcggctc acctactcgg tgaccctaat cagatccctg
 3421 ctatcgattt tgaacaacgc ggctggctc ccgcatccg ccccgagctt gcaccaacga
 3481 gctgggtggca cgtcacacac cgttgcccgg ccgatgtgtg cgaactcata cgcggggcct
 3541 acccaaaaat ccagaccacg agccgtgtgc tacggctcct gttttggaat gaaccggcta
 3601 tcggccagaa gttggtttty acgcaggctg ccaaggccgc taaccctggt gcgattacgg
 3661 ttcaogaagc tcagggtgcc accttcaactg agaccacagt tatagccaag gccgacgcca
 3721 ggggctcat tcagtcaccc cgggcccctg ctatagttgc acttaccgcg cacaccgaga
 3781 agtgogtcat tttggatgct cccggcctgc tgcgtgaagt sggatctcgt gatgtgattg

10

20

30

40

3841 tcaataattt tttccttgca ggcggagagg tgggcoatca ccgccccttct gtgatacccc
 3901 gcggtaaccc cgatcagaac ctccgggactt tacaagcctt cccgcccgtcc tgccagatta
 3961 gtgcttacca ccagctggct gaggaattag gccatcgccc tgcccctggt gccgcccgtct
 4021 tgcccccttg ccccgagctt gagcagggcc tgctttacat gccacaagag cttaccgtgt
 4081 ctgatagtgt gctgggtttt gagcttaocg acatagtcca ctgcccgatg gccgctccaa
 4141 gccagcgaag ggctgttctt tcaacacttg tggggcggta tggcccgtagg acgaagtat
 4201 atgaggcagc acattcagat gtccgtgagt ccctagcccag gttcatcccc actatcgggc
 4261 ccgttcaggc caccacatgt gagttgtatg agttgggtga ggccatggtg gagaagggtc
 4321 aggacgggtc agccgtctta gagctagatc tctgcaatcg tgatgtctcg cgcacacat
 4381 ttttccaaa ggattgcaac aagtttacia ctggtgagac tattgcccac ggcaagggtg
 4441 gtcagggtat atcggcctgg agcaagacct tctgcccctt gtttggcccg tggttccgtg
 4501 ccattgagaa agaaatactg gccctgctcc cgcctaagt cttttatggc gatgcttatg
 4561 aggagtcaat gcttgctgcc gctgtgtcag gggcggggtc atgcatggta tttgaaaatg
 4621 acttttcgga gtttgatagc acccagaaca acttctctct cggccttgag tgtgtggtta
 4681 tggaggagtg cggcatgcct caatggttaa ttaggttgta tcacctggta cggtcagcct
 4741 ggattctgca ggcgccaag gagtctotta agggtttctg gaagaagcat tctggtgagc
 4801 ccggtaccct tctttggaac accgtttggg acatggcaat catagcacat tgctacgagt
 4861 tccgtgactt tctgtgtgct gcctttaagg gtgatgattc ggtggtctc tgtagcact
 4921 accggcagag ccgcaatgcg gcagcttga ttgctggctg tgggcttaa ttgaagggtg
 4981 actatcggcc cattgggctg tatgctgggg tgggtggggc ccctggcttg gggacactgc
 5041 ctgatgtggt gcgttttctt ggtcggctgt ctgaaaagaa ttggggcccc ggcccggaac
 5101 gtgctgagca gctacgtctt gctgtttgtg atttccttct agggttgacg aacgttgcgc
 5161 aggtctgtgt tgatgttgtg tcccgtgtct atggagttag ccccgggctg gtacataacc
 5221 ttattggcat gttgcagacc attgcccgat gcaaggccca ctttacagag actatataac
 5281 ctgttcttga tcttaciaat tccatcatac agcgggtaga atgaataaca tgtttgttgc
 5341 atcggccatg ggatcaccat gtgcccctagg gttgttctgc tgctgttctt cgtgttctg
 5401 cctatgctgc ccgcccacc ggcccggccag ccgtctggcc gtcgtcgtgg gcggcgcagc
 5461 ggcgggtgccc gcgggtggtt ctgggggtgac agggttgatt ctcagccctt cgcctcccc
 5521 tatattcctc caaccaaccc cttcgcgcc gatatcgttt cacaatccgg ggctggaact
 5581 cgcctctggc agcccggccc cccccttggc tccgcttggc gtgaccagtc ccagcggccc
 5641 tccgctgccc cccgcccctg atctgcccc gctggggctg cgccttgac tgctgtatca
 5701 ccagcccctg acacagcccc tgtacctgat gttgattcac gtggtgctat tctgcgtcgg
 5761 cagtataatt tgtccaagtc cccgctcag tcactgttg cttcgggtac caatttgggt

10

20

30

40

5821 ctctacgctg ccccgctaaa tcccctcttg cccctccagg atggcaccaa caccatatac
 5881 atggctactg aggcatccaa ctatgctcag taocgggtcg ttcgagctac gatccgctac
 5941 cccccgctgg tgccgaatgc tgttggtggt tatgctatatt ctattttcttt ttggcctcaa
 6001 actacaacta cccctacttc tgttgatatg aattctatta cttccactga tgttaggatt
 6061 ttggtccagc ccggtattgc ctccgagtta gtcaccccta gtgagcgcct tcattatcgc
 6121 aatcaaggct ggcgctctgt tgagaccaca ggtgtggctg aggaggaggc tacctccggt
 6181 ctggtaatgc tttgcattca tggctctcct gttaactctt atactaatac accttacct 10
 6241 ggtgcgttgg ggctccttga ttttgcacta gagcttgaat tcaggaattt gacacccggg
 6301 aacaccaaca cccgtgttcc ccggtatacc agcacagccc gtcacgcggt gcgcccgggt
 6361 gctgatggga ccgctgagct tactaccaca gcagccacac gatttatgaa ggatctgcat
 6421 ttcactggca ctaatggcgt tggtagggtg ggtcgcggta tcgccctgac actgttcaat
 6481 cttgctgata cgcttctagg tggtttaacc acagaattga tttcgtcggc tgggggtcag
 6541 ttgttctact cccgcctgt tgtctcggcc aatggcgagc cgacagtga gttatacaca
 6601 tctgtggaga atgcgcagca agacaagggc attacatcc cacacgatat agatttgggt 20
 6661 gactcccgtg tggttattca ggattatgat aatcagcacg agcaagaccg acccacgccc
 6721 tcacctgcc cctcacgccc tttctcagtc cttcgcgcta acgatgtttt gtggctctcc
 6781 ctcaactgcc ctgagtaoga tcaggctacg tatgggtcgt ctaccaaccc tatgtatgtc
 6841 tctgatacag ttacotttgt caatgtggcc actgggtgctc aggctgttgc ccgctctctt
 6901 gattggtcta aagttacttt ggatggctgc ccccttacta ccattcagca gtattctaag
 6961 acattttatg ttctcccgt ccgcgggaag ctgtcctttt gggaggctgg cacaactagg 30
 7021 gccggctacc catataacta taacaccact gctagtgatc aaattctgat tgagaatgcg
 7081 gccggccatc gtgtogetat ctccacctac actaccagcc tgggtgcccg ccctacctcg
 7141 atctccgagg tgggtgtatt agccccacac tcggcccttg ctgttcttga ggacactggt
 7201 gattaccctg ctcgtgctca cacttttgat gatttctgcc cggagtgtcg taccctaggc
 7261 ttgcaggggt gtgcattcca gtccactatt gctgagcttc agcgccttaa aacggaggta
 7321 ggcaaaaacc gggagtotta attaattcct tccgtgcccc cttcgcagtc ttcttttgg
 7381 ctttatttct tatttctgct ttccgcgctc cctggaaaaa aaaaaaaaaa 40

SEQ ID NO: 2 「ORF1」アミノ酸配列;下線を引いた領域は超可変領域中の挿入物である

/codon_start=1
 /product="non-structural protein"
 /protein_id="ADV71352.1"
 /db_xref="GI:319748766"

MEAHQFIKAPGITTAIEQAALAAANSALANAVVVRPFLSRLQTE
 ILINLMQPRQLVFRPEVLWNHPIQRVIHNELEQYCRARAGRCLEVGHAHPRSINDNPNV
 LHRCFLRPVGRDVQRWYSAPTRGPAANCRRSALRGLPPVDRTYCFDGFSRCAFAAETG
 VALYSLHDLWPAADVAEAMARHGMRTRYAALHLPPEVLLPPGTYHTTSYLLIHDGDRAV
 VTYEGDTSAGYNHDVSI LRRAWIRTTKI VGDHPLVIERVRAIGCHFVLLLLTAAPEPSM
 PYVPYPRSTEVYVRSIFGPGGSPSLFPSACSTKSTFHAVPVHIWDRMLFGATLDDQA
 FCCSRLMTYLRGISYKVTVGALVANEGWNA SEDALTAVITAAAYLTICHQRYLRTQAIS
 KGMRRLEVEHAQKFITR LYSWLF EKSGRDYI PGRQLQFYAQRRWLSAGFHLDPRVLV
 FDESVP CR CRTFLKKVAGKFC FMRWLGQECTCFLEPAEGLVGDHGH DNEAYEGSEVD
 QAEPALHDVSGTYAVHGHQLVALYRALNVP HDIAARASRLTATVELVAGPDRLECRTV
 LGNKTFRTTVVDGAHLEANGPEQYVLSFDASRQSMGAGSHNLTYELTPAGLQVRISN
 GLDCTATFP PPGAPSAA PGEVAAFCAALYRYNRFTQRHSLTGGLWLHPEGLLGI FPPF
 SPGHIWESANPFCGEGTLYTRTWSTSGFSSDFSPPEAAA PASAAAPGLPHPTPPASDI
 WALPPPSEECYTR LGND FHTNKRVCEEIAI I PSKKPRNKMAGYVTHLMKRIQRGPVRG
ISIKLQEEAQVDAASVPLTLVPAGSPSPVSPSPPPPPVVRKSTPPPSRTRRLLYTY
 PDGAKVYAGSLFESDCDWLVNASNPGHRP GGGLCHAFHQRFPEAFYPTEFIMREGLAA
 YTLTPRPI IHAVAPDYRVEQNPKRLEAA YRETC SRRGTAAAYPLLGSGIYQVPVLSLSD
 AWERNHRPGDELYLTEPAAAWFEANKPAQPAL TITEDTARTASLAL EIDAATEVGRAC
 AGCTISPGIVHYQFTAGVPGSGKSR S IXQGDVDVVVPTREL RNSWRRRGFAAFTPHT
 AARVTNGRRVVIDEAPSLP PHL LLLHMQRASSVHLLGDPNQIP AIDFEHAGLVPAIRP
 ELAPTSWWHVTHRC PADVCELIRGAYPKIQ TTSRVLRS LFWNEPAIGQKLVFTQAAKA
 ANPGAITVHEAQGATFTETT VIATADARGLIQSSRAHAI VALTRHTEKCVILDAPGLL
 REVGISDVI VNNFFLAGGEVGHHRPSVI PRGNPDQNLGTLQAFPPSCQISAYHQLAEE
 LGHRPAPVAAVLP PCPELEQGLLYMPQELTVSDSVLV FELTDIVHCRMAAPSQRKAVL
 STLVGGRYGRRTKLYEAAHS DVRESLARFIPTIGPVQATTCELYELVEAMVEKGDGSA
 VLELDLCNRDVSRI TFFQKDCNKFTTGETIAHGKVGQGISAWSKTF CALFGPWFR AIE
 KEILALLPPNVFYGDAYEESV LAAAVSGAGSCMVFENDFSEFDSTQNNFSLGLECVVM
 EECGMPQWLIRLYHLVRS AWILQAPKESL KGFWKKHSGE PGTLWNTVWNMAI IAHCY
 EFRDFRVA AFKGDSDSVLCS DYRQSRNAAALIAGCGLKLV D YRPIGLYAGVVVAPGL
 GTLPDVVRFAGRLSEKNWGPGERAEQLRLAVCDFLRGLTNVAQVCVDVVSRYGVSP
 GLVHNLIGMLQTIADGKAHFTETIKPVLDLTNSIIQRVE

10

20

30

40

/codon_start=1
 /product="viral protein"
 /protein_id="AD71353.1"
 /db_xref="GI:319748767"

MGSPCALGLFCCCSSCFCLCCPRHRPASRLAVVVVGAAAVPAVV
 SGVTGLIILSPSPSIFIQPTSPPI SFHNPGLLELALGSRPAPLAPLGVTSAPSAPPLPP
 AVDLPQLGLRR

10

SEQ ID NO: 4 ORF2 CDS:5359 ~ 7341

/codon_start=1
 /product="capsid protein"
 /protein_id="ADV71354.1"
 /db_xref="GI:319748768"

MCPRVLLLLFFVFLPMLPAPPAGQPSGRRRRGRRSGGAGGGFWGD
 RVDSQPFALPYIHPTNPFAADIVSQSGAGTRPRQPPLGSAWRDQSQRPSAAPRRRS
 APAGAAPLTAVSPAPDTAPVPDVSARGAILRRQYNLSTSPLTSSVASGTNLVLYAAPL
 NPLLPLQDGTNTHIMATEASNIAQYRVVRATIRYRPLVPNAVGGYAISISFWPQTTTT
 PTSVDMNSITSTDVIRILVQPGIASLVIPISERLHYRNQGWRSVETTTGVAEEEEATSGLV
 MLCIHGSPVNSYTNTPYTALGLLDFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYTSTARHRLRRG
 ADGTAELTTTAATRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNLADTLGGLPTELISSAG
 GQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQDQKGITIPHDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQD
 RPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAYDQATYGSSTNPMYVSDTVTFVNVATGAQ
 AVARSLDWSKVTLDGRPLTTIQYKTFYVPLRGKLSFWEAGTTRAGYPYNYNTTAS
 DQILIEAAGHRVAISTYTTSLGAGPTSISAVGVLAPHSALAVLEDTVDYPARAHTFD
 DFCPECRTLGLQGCAFQSTIAELQRLKTEVGKTRES

20

30

SEQ ID NO: 5 Kernow C1 HEV核酸配列

1 ggcagaccac gtatgtggtc gatgccatgg aggccacca gttcattaag gctcctggca
 61 ttactactgc cattgagcag gctgctctgg ctgcggccaa ttccgccttg gcgaatgctg
 121 tgggtggttcg gccgttttta tcccgtctac aaacygagat tcttatcaat ttgatgcaac
 181 cccggcagtt ggttttccgc cctgaagtgc tttggaatca tcctatccag cgggttatac
 241 acaatgaact agaacagtac tgccgggccc gtgctggccg ctggttgagg gtcggagccc

40

301 atccgagatc tattaatgat aaccccaacg tcttgcaacc gtgcttcctt agaccggttg
 361 gcagggatgt tcagcgctgg tactctgccc ccaccctggg cctgcgggcc aattgccgcc
 421 gctccgcgct gcgtggcctc cccccggtg accgcaccta ctgttttgat ggattctccc
 481 gttgtgcttt tgctgcagag accggtgtgg ccctttactc tttgcatgac ctttggccag
 541 ctgatgttgc agaggggatg gcccgtcatg ggatgacacg gttgtatgcc gcactacatc
 601 ttccctcctga ggtgctgcta ccaccgggca cctatcacac aacttcgtat ctccctgattc
 661 acgacggcga tcgcgccggt gtaacctatg agggcgatac cagtgcgggc tataaccatg
 721 atgtttccat acttcgtgcy tggatccgta ctactaaaat agttgggtgac caccctgttg
 781 ttatagagcg tgtgcggggc attggttgtc atttcgtgct gttgctcacc gcggccctg
 841 agccgtcacc tatgccttat gtcccctacc ctggttcaac ggaggtgtat gttcggctca
 901 tatttgcccc tggcggctct ccatccttgt ttccgtcagc ctgctctact aaatctacct
 961 tccatgctgt cccggtccat atctgggata ggcctcatgct ctttggtgcc accctggatg
 1021 atcagggcgt ctgttgttca cgactcatga cttacctccg tggatttagc tacaaggcca
 1081 ctgttgggtgc gcttgttgc t aatgaggggt ggaacgcctc tgaagatgct cttactgcag
 1141 tgatcactgc ggcttatctg actatctgcc atcagcgcta cctccgtacc caggcgatat
 1201 ccaagggcat gcgccggttg gaggttgagc atgcccagaa atttatcaca agactctaca
 1261 gttggctatt tgagaagtct ggccgtgatt acatccccgg ccgccagctc cagttttatg
 1321 cacagtgccg acggtggcta tctgcaggat tccatctgga ccccagggtg cttgtttttg
 1381 atgaatcagt gccatgtcgt tgtaggacgt tcttgaagaa agtcgcgggt aaattctgct
 1441 gttttatgcy gtggttaggg caggagtga cctgcttctt ggagccagcc gagggtttag
 1501 ttggcgacca tggccatgac aatgaggctt atgaaggttc tgaggtcgac caggctgaac
 1561 ctgcccctct tgatgtttcg gggacttatg ccgtcccacgg gcaccagctt gtagccctct
 1621 atagggcact taatgtccca catgatattg ccgctcgagc ttcccgacta acggctactg
 1681 ttgagcttgt tgcaggcca gaccgcttgg agtgccgcac tgtgctcggc aataagacct
 1741 tccggacgac ggtggttgat ggcgcccata ttgaagcgaa tggcccagag cagtatgtcc
 1801 tgtcatttga cgcctcccgt cagtctatgg gggccgggtc gcacaacctc acttatgagc
 1861 tcaccctgcy cggtttgag gttaggatct catctaacgg tctggattgc actgctacat
 1921 tccccccgg cggtgcccct agcgcgcgcy caggggaggt ggcagccttc tgtggtgcc
 1981 tttatagata taacaggttc acccagcggc actcgctgac cgggtgacta tggttacacc
 2041 ctgagggatt gctgggcata ttccctccat tctcccctgg gcatactgcy gactctgcta
 2101 accccttttg cggggagggg actttgtata ccggacctg gtcaacatct ggcttttcta
 2161 gtgatttctc tccccctgag ggggcgcgcc ctgcttcggc tgcctgcccc gggctgcccc
 2221 atcctacccc gcctgttagt gatatttggg cgttaccacc gccctcagag gactctcagg

10

20

30

40

2281 tcgatgcagc atctgtgcc cttaccctcg tgctgctgg gtcgcccac cctattgtgt
 2341 taootycccc cccccccct cccccctgc gtaagccatc aacacccccg ccttctcgta
 2401 cccgtgcct cctctacacc tatcccagc ggcctaaggt gtatgcaggg tcattgtttg
 2461 aatcagactg tgattggctg gttaacgcct caaacccggg ccatcgccct ggaggtggcc
 2521 tctgtcatgc ctttcatcaa cgttttccag aggcgtttta ttggactgaa ttcattatgc
 2581 gtgagggcct agcggcatac accctgacc cgcgccctat catccacgca gtggcgcccg
 2641 actacagggg tgagcagaac ccgaagaggc tcgaggcagc gtaccgggaa acttgctccc 10
 2701 gtcgtggcac cgtgcttac ccgcttttag gctcgggcat ataccaggtc cctgtcagcc
 2761 tcagttttga tgctgggaa cgcaatcatc gccccggcga tgagctttac ttgactgagc
 2821 ccgctgcggc ttggtttgag gctaataagc cggcgcagcc ggcgcttacc ataactgagg
 2881 acacggctcg tacggccaac ctggcactag agatcgacgc cgctacagag gttggccgtg
 2941 cttgtgccgg ctgcactatc agtccctggga ttgtgacta tcagtttacc gctggggctc
 3001 cgggctcggg caagtcaagg tccatacaac agggagatgt cgatgtggtg gttgtgccc 20
 3061 cccgggagct ccgtaatagt tggcgcgcc ggggtttcgc ggctttcaca cccacacag
 3121 cggcccgtgt tactaacggc cgcgcgctg tgattgatga ggccccatct ctcccgccac
 3181 acctgttgct gctacatatg cagcgggct cctcggcca cctactcggg gacccaaatc
 3241 agatccctgc tatcgatttt gaacacgcc gctcggctcc cgcgatccgc ccgagcttg
 3301 caccaacgag ctggtggcac gtcacacacc gctgcccggc cgatgtgtgc gaactcatac
 3361 gcggggccta ccccaaaatc cagaccacga gccgtgtgct acggtcctc ttttggaatg
 3421 aaccggctat cggccagaag ttggttttta cgcaggctgc caaggccgct aacctgggtg 30
 3481 cgattacggg tcacgaagct cagggtgcc ccttactga gaccacagtt atagccacgg
 3541 ccgacgccag gggcctcatt cagtcatccc gggcccatgc tatagttgca cttaccgcc
 3601 acaccgagaa gtgcgtcatt ttggatgctc ccggcctgct gcgtgaagtc ggtatctcgg
 3661 atgtgattgt caataatttt ttccttgag cgggagagg cggccatcac cgccttctg
 3721 tgataccccg cggtaacccc gatcagaacc tcgggacttt acaagccttc ccgcgctcct
 3781 gccagattag tgcttaccac cagctggctg aggaattagg ccatcgccct gccctggtg
 3841 ccgcgctctt gcccccttgc cccgagcttg agcagggcct gctttacatg ccacaagagc 40
 3901 ttaccgtgtc tgatagtgtg ctggtttttg agcttacgga catagtccac tgccgcatgg
 3961 ccgctccaag ccagcgaag gctgttcttt caacacttgt ggggcgggat ggccgtagga
 4021 cgaagttata tgaggcagca cattcagatg tccgtgagtc cctagccagg ttcacccca
 4081 ctatcgggcc cgttcaggcc accacatgtg agttgtatga gttggttgag gccatgggtg
 4141 agaaggggtc ggacgggtca gccgtcttag agctagatct ctgcaatcgt gatgtctcgc
 4201 gcatcacatt tttccaaaag gattgcaaca agtttacaac tgggtgagact atcgcccatg

4261 gcaaggttgg tcaggggtata tcggcctgga gcaagacctt ctgcgctttg tttggcccgt
 4321 ggttccgtgc cattgagaaa gaaatactgg ccctgctccc gcctaattgtc ttttatggcg
 4381 atgcttatga ggagtcagtg tttgctgccg ctgtgtcagg ggcgggggtca tgcattggtat
 4441 ttgaaaatga cttttcggag tttgatagca cccagaacaa cttctctctc ggcccttgagt
 4501 gtgtggttat ggaggagtgc ggcatgcctc aatggttaat taggttgat cacctggtac
 4561 ggtcagcctg gattttgcag gcgcccagg agtctcttaa gggtttytg aagaagcatt
 4621 ctggtgagcc cggtagcctt ctttggaaca ccgtttgaa catggcaatc atagcacatt
 4681 gctacgagtt ccgtgacttt cgtgttgctg cctttaaggg tgatgattcg gtggtcctct
 4741 gtagegacta ccggcagagc cgcaatgcgg cagctttgat tgctggctgt gggcttaaat
 4801 tgaaggttga ctatcgcctc attgggctgt atgctggggg ggtgggtggc cctggcttgg
 4861 ggacactgcc tgatgtggtg cgttttgctg gtcggctgtc tgaaaagaat tggggccccg
 4921 gcccggaacg tgctgagcag ctacgtcttg ctgtttgta tttccttca gggttgacga
 4981 acgttgcgca ggtctgtggt gatgttggtt ccogtgtcta tggagttagc cccgggctgg
 5041 tacataacct tattggcatg ttgcagacca ttgccgatgg caaggccac tttacagaga
 5101 ctattaaacc tgttcttgat cttacaaatt ccatcataca gcgggtagaa tgaataacat
 5161 gtttggtgca tcgcccattg gatcaccatg cgccttaggg ttggtctgct gctgttcttc
 5221 gtgtttctgc ctatgctgcc cgcgcccacg gccggccagc cgtctggccg tcgtcgtggg
 5281 cggcgcagcg gcgggtgccg cgggtggttc tggggtgaca gggttgattc tcagcccttc
 5341 gccctcccct atattcatcc aaccaacccc ttccgcccgg atgtcgtttc acaatccggg
 5401 gctggaactc gccctcggca gccgccccgc ccccttggct ccgcttggcg tgaycagtcc
 5461 cagcgcacct ccgctgcccc ccgcccgtga tctgccccag ctggggctgc gccgttgact
 5521 gctgtatcac cggcccctga cacagccctt gtacctgatg ttgattcacg tgggtctatt
 5581 ctgctgcggc agtataatth gtccacgtcc ccgctcacgt catctgttgc ttcgggtacc
 5641 aacttggttc tctacgctgc ccogctaaat cccctcttgc cctccagga tggcaccaat
 5701 acccatatca tggctactga ggcatccaac tatgctcagt atcgggtcgt tcgagctacg
 5761 atccgctacc gcccgctggt gccaaatgct gttgggtggt atgctatttc tatttctttt
 5821 tggcctcaaa ctacaactac cctacttct gttgatatga attccatcac ttccactgat
 5881 gttaggatth tggccagcc cggatttgc tccgagttag tcatccctag tgagcgcctt
 5941 cattatcgca atcaaggctg gcgctctggt gagaccacag gtgtggctga ggaggaggct
 6001 acctccggtc tggtaatgct ttgcattcat ggctctcctg ttaactctta tactaataca
 6061 ccttacactg gtgcggtggg gctccttgat tttgcaactag agcttgaatt caggaacttg
 6121 acaccggga acaccaacac ccgtgtttcc cggtatacca gcacagccc ccatcgggtg
 6181 cgcgcgggtg ctgatgggac ccgtgagctt actaccacag cagccacacg atttatgaag

10

20

30

40

6241 gatctgcatt tcaactggtac taatggcggt ggtgaggtgg gtcgcggtat cgcctgaca
 6301 ctggtcaatc tcgctgatac gcttctaggt ggtttaccga cagaattgat ttcgctcggct
 6361 gggggctcagt tggtctactc ccgcctgtt gtctcggcca atggcgagcc gacagtaaag
 6421 ttatacacat ctgtagagaa tgcgcagcaa gacaaggga ttaccatccc acacgatata
 6481 gatttgggtg attcccgtgt ggttattcag gattatgata atcagcacga gcaagaccga
 6541 cccacgccgt cacctgcccc ctcacgcctt ttctcagtec ttcgcgctaa cgatgttttg
 6601 tggctctccc tcaactgccc tgagtagcat cagactacgt atgggtcgtc taccaaccct 10
 6661 atgtatgtct ctgatacagt cacctttgtc aatgtggcca ctggtgctca ggctgttgcc
 6721 cgctctcttg attggtctaa agttactttg gatggctgcc cccttactac cattcagcag
 6781 tattctaaga cattctatgt tctcccgctc cgcggaagc tgccttttg ggaggctggc
 6841 acaactaggg ccggtacccc atataactat aacaccactg ctagtgatca aattctgatt
 6901 gagaatgcgg ccggccatcg tgctgctatc tccacctaca ctaccagcct ggggtgccgg
 6961 cctacctcga tctccgcggt ggggtgatta gcccacact cggcccttgc tgttcttgag 20
 7021 gacactgttg attaccctgc tcgtgctcac acttttgatg atttctgccc ggagtgccgt
 7081 accctagggt tgcagggttg tgcattccag tccactattg ctgagcttca ggccttaaa
 7141 atgaaggtag gcaaaacccg ggagtcttaa ttaattcctt tcgtgcccc ttcgcagtct
 7201 tcctttckgc tttatttctt atttctgctt cccgcgctcc ctggaaaaaa aaaaaaaaaa
 7261 aaaa

SEQ ID NO: 6 Kernow C1 ORF1 CDS:27 ~ 5153

/codon_start=1

/product="polyprotein"

/protein_id="ADV92628.1"

/db_xref="GI:320005195"

MEAHQFIKAPGITTAIEQAALAAANSALANAVVVRPFLSRLQTE

ILINLMQPRQLVFRPEVLWNHPIQRVIHNELEQYCRARAGRCLEVGHAHPRSINDNPNV

LHRCFLRPVGRDVQRWYSAPTRGPAANCRRSALRGLPPVDRTYCFDGFSRCAFAAETG

VALYSLHDLWPADVAEAMARHGMTRLYAALHLPPEVLLPPGTYHTTSYLLIHDGDRAV 40

VTYEGDTSAGYNHDVSILRAWIRTTKIIVGDHPLVIERVRAIGCHFVLLLTAPEPSPM

PYVPYPRSTEVYVRSIFGPGGSPSLFPSACSTKSTFHAVPVHIWDRMLMFGATLDDQA

FCCSRLMTYLRGISYKVTVGALVANEGWNASDALTAVITAAAYLTICHQRYLRTQAIS

KGMRRLEVEHAQKFITRLYSWLFEKSGRDYIPGRQLQFYAQRRWLSAGFHLDPRVLV

FDESVPCCRCRTFLKKVAGKFCFMRWLGQECTCFLEPAEGLVGDHGHNEAYEGSEVD

QAEPALHDVSGTYAVHGHQLVALYRALNVPHDIAARASRLTATVELVAGPDRLECRTV
 LGNKTFRTTVVDGAHLEANGPEQYVLSFDASRQSMGAGSHNLTYELTPAGLQVRISSN
 GLDCTATFPPGGAPSAAPGEVAAFCGALYRYNRFTQRHSLTGGLWLHPEGLLGIFPPF
 SPGHIWESANPFCGEGTLYTRTWSTSGFSSDFSPPEAAAPASAAAPGLPHPTPPVSDI
WALPPPSEESQVDAASVPLTLVPAGSPNPIVLPXPPPPPPVRKPKSTPPPSRTRRLLYT
 YPDGAKVYAGSLFESDCDWLVNASNPGHRPGGGLCHAFHQRFPEAFYWTEFIMREGLA
 AYTLTPRPIIHAVAPDYRVEQNPKRLEAAAYRETCSRRTAAAYPLLGSGIYQVPVLSLF
 DAWERNHRPGDELYLTEPAAAWFEANKPAQPALTITEDTARTANLALEIDAATEVGRA
 CAGCTISPGIVHYQFTAGVPGSGKRSIQQGDVDVVVVPTRELNSWRRRGFAAFTPH
 TAARVTNGRRVVIDEAPSLPPLLHLMQRASSVHLLGDPNQI PAIDFEHAGLVPAIR
 PELAPTSWWHVTHRCPADVCELIRGAYPKIQTTSRVLRSLFWNEPAIGQKLVFTQAAK
 AANPGAITVHEAQGATFTETTVIATADARGLIQSSRAHAI VALTRHTEKCVILDAPGL
 LREVGISDVI VNNFFLAGGEVGHHRPSVI PRGNPDQNLGTLQAFPPSCQISAYHQLAE
 ELGHRPAPVAAVLPPCPELEQGLLYMPQELTVSDSVLVFELTDIVHCRMAAPSQRKAV
 LSTLVGRYGRRTKLYEAAHSDVRESLARFIPTIGPVQATTCELYELVEAMVEKQDGS
 AVLELDLCNRDVSRI TFFQKDCNKFTTGETIAHGKVGQGISAWSKTFCALFGPWFRAI
 EKEILALLPPNVFYGDAYEESVFAAAVSGAGSCMVFENDFSEFDSTQNNFSLGLECVV
 MEECGMPQWLIRLYHLVRSAWILQAPKESLKGFWKKHSGEPGTLWNTVWNMAIIAHC
 YEFRDRVAAFKGDSDSVLCSYRQSRNAAALIAGCGLKLVKDYRPIGLYAGVVVAPG
 LGTLPDVVRFAGRLSEKNWGPGERAEQLRLAVCDFLRGLTNVAQVCVDVVSRYGVS
 PGLVHNLIGMLQTIADGKAHFTETIKPVLDLTNSIIQRVE

10

20

30

SEQ ID NO: 7 Kernow C1 HEV ORF3 CDS:5177 ~ 5518

/codon_start=1
 /product="unknown"
 /protein_id="ADV92630.1"
 /db_xref="GI:320005197"

MGSPCALGLFCCCSCFCLCCPRHRPASRLAVVVGAAAAPAVV
 SGVTGLILSPSPSIFIFIQPTSPPPMSFHNPGLLELALGSRPAPLAPLGVXSPSAPPLPP
 AVDLPQLGLRR

40

SEQ ID NO: 8 Kernow C1 HEV ORF2 CDS:5188 ~ 7170

```

/codon_start=1
/product="capsid protein"
/protein_id="ADV92629.1"
/db_xref="GI:320005196"

```

```

MRPRVLLLLFFVFLPMLPAPPAGQPSGRRRGRSSGGAGGGFWGD
RVDSQPFALPYIHPTNPFADVVSQSGAGTRPRQPPLGSAWRDQSQRPSAAPRRRS
APAGAAPLTAVSPAPDTAPVPDVDSRGAILRRQYNLSTSPLTSSVASGTNLVLYAAPL
NPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAQYRVVRATIRYRPLVPLNAVGGYAISSISFWPQTTTT
PTSVDMNSITSTDVRIIVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETTGVAEEEEATSGLV
MLCIHGSPVNSYTNTPYTALGLLDFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYTSTARHRLRRG
ADGTAELTTTAATRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNLADTLGGLPTELISSAG
GQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQDKGITIPHDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQD
RPTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQTTYGSSTNPMYVSDTVTFVNVATGAQ
AVARSLDWSKVTLDGRPLTTIQYSKTFYVLPRLGKLSFWEAGTTRAGYPYNYNTTAS
DQILIEAAGHRVAISTYTTSLGAGPTSISAVGVLAPHSALAVLEDTVDYPARAHTFD
DFCPECTRLGLQGCAFQSTIAELQRLKMKVKGKTRES

```

10

20

SEQ ID NO: 9 HEV Kernow遺伝子型3の複製する変種中に存在するORF1挿入断片

CYTRLGNDFHTNKRVC EEIAIIPSKKPRNKMAGYVTHLMKRIQRGPPVIRGISIKLQEEA

SEQ ID NO: 10 HEV Kernow遺伝子型の複製する変種中のさらなる挿入断片をコードする核酸

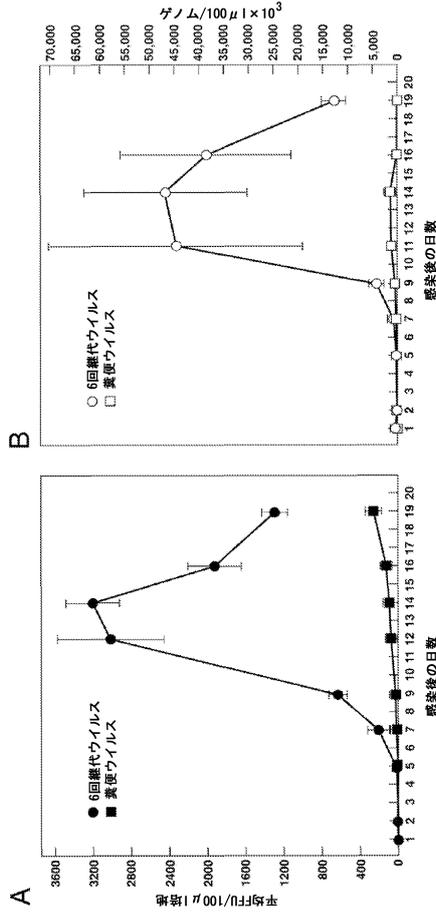
```

TGATATTTGGGCGTTACCACCGCCCTCCGAGGAGG-----
TAAAAGACAAAGATGATCTGGGGCCTGACAGATTCTCAACACTCCCAGCCCTAGACTCAGTGCGCAAGCTCAGGT
GGCTGAGGATATTACCATTTAGAAAAGAAAGGAAAACAAG-----
AGCAGGTCGATGCAGCATCTGTGCCCTTACC

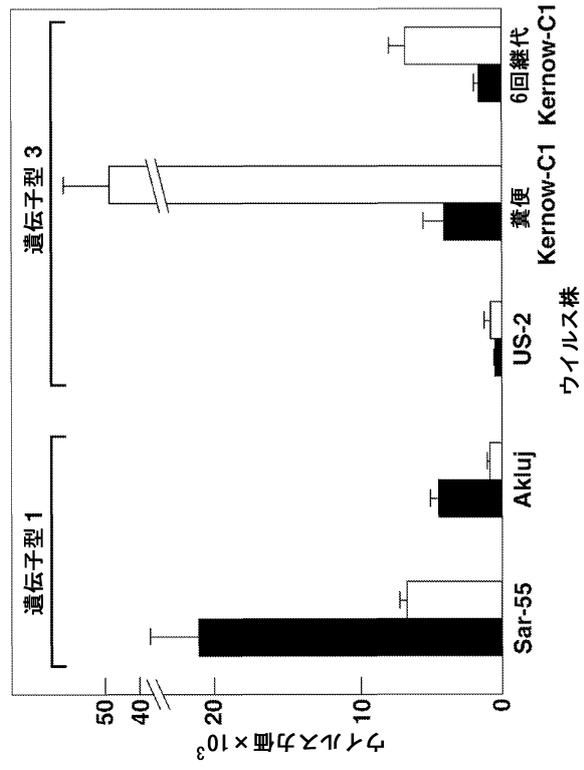
```

30

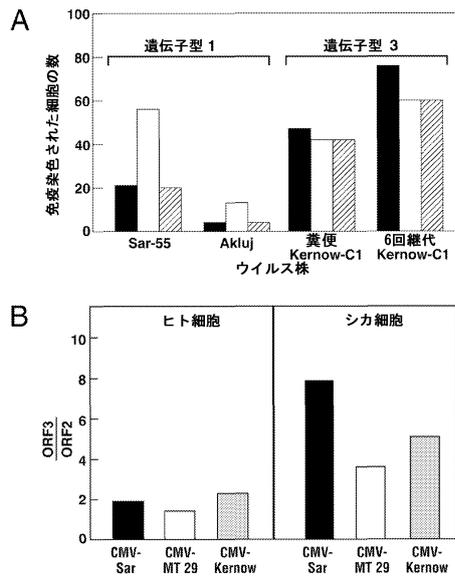
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

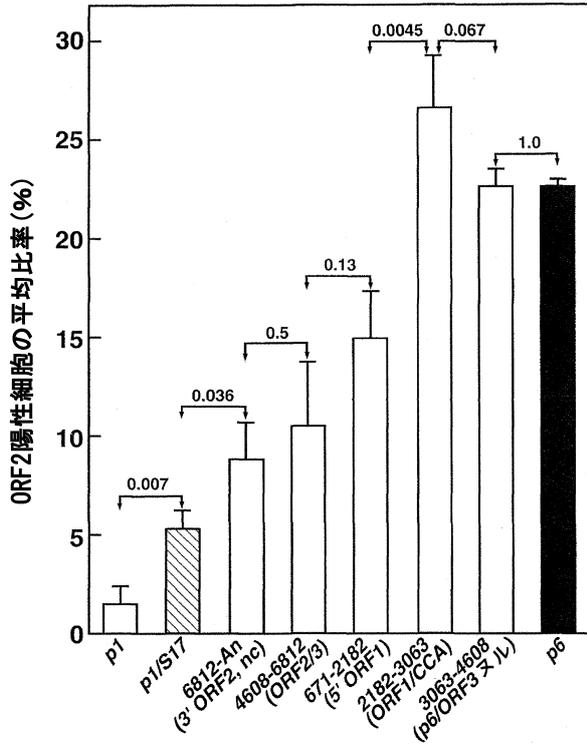


【 図 4 】

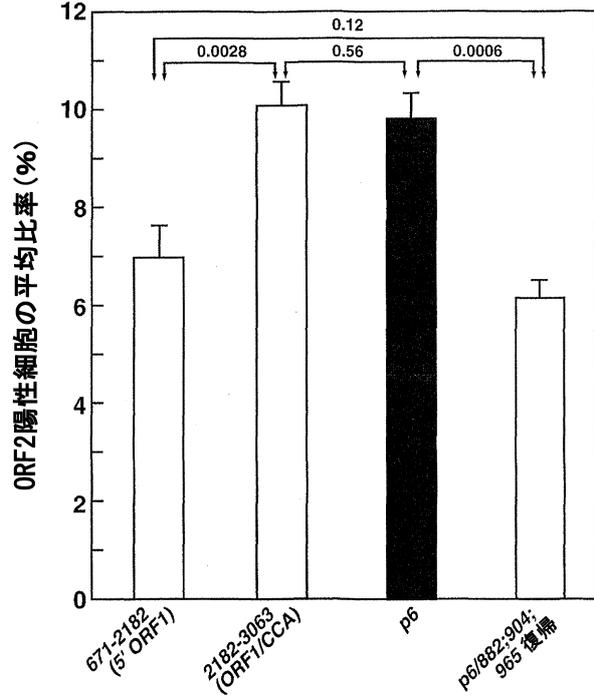
A (HEV) 2267 CGAGGAGTGCTACACGGCTGGCAACGATTCACACGAAACGCGGTGTCGAGGAGATCGCCAT
 (S17) 76 CTACACGGCTGGCAACGACTTCACACGAAACGCGGTGTCGAGGAGATCGCCAT 135
 TATCCCTAGCAAAAGCCCGCAACAGATGGCGTTATGTCACGCATCTGATGAAGGG 122
 136 TATCCCGAGCAAAAGCTCCGCAACAGATAGCAGGTTATGTCACGCATCTGATGAAGGG 195
 AATTCAGAGAGCCCGCAAGAGGTTATCCATCAAGCTGCAGGAGGAGGCTCAGGTCC 2283
 196 AATTCAGAGAGCCCGCAAGAGGTTATCCATCAAGCTGCAGGAGGAGG 245

**B (HEV) ALPPPSECYTRLGDNDFHTNKRVC EE I A I I P S K K P R N K M G Y V T H L M K R I O R G P V R G I S I K L Q E E A Q V D A A S V
 (S17) 21 YTRLGDNDFHTNKRVC EE I A I I P S K K L R N K I A G Y V T H L M K R I O R G P V R G I S I K L Q E 75**

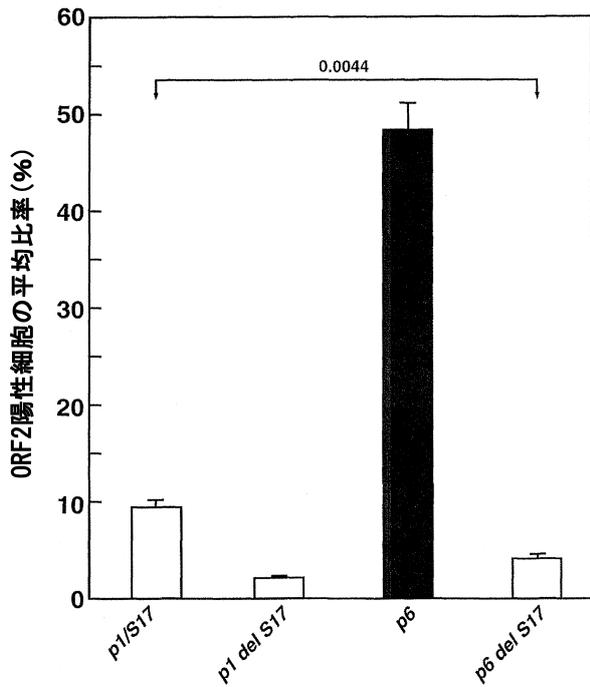
【 図 5 】



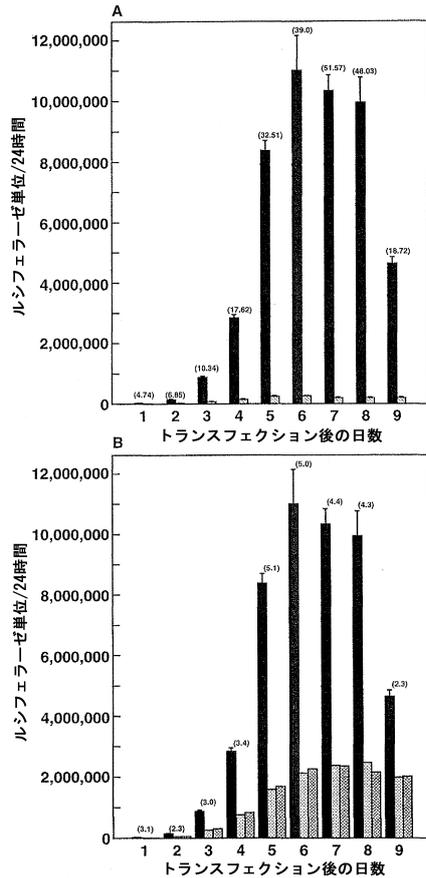
【 図 6 】



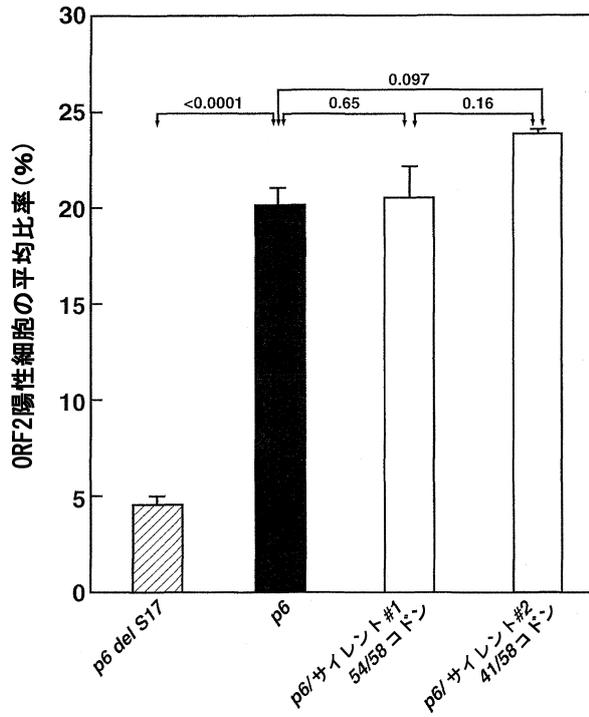
【 図 7 】



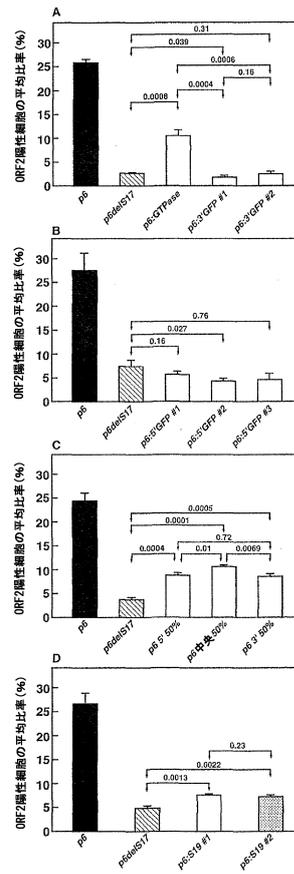
【 図 8 】



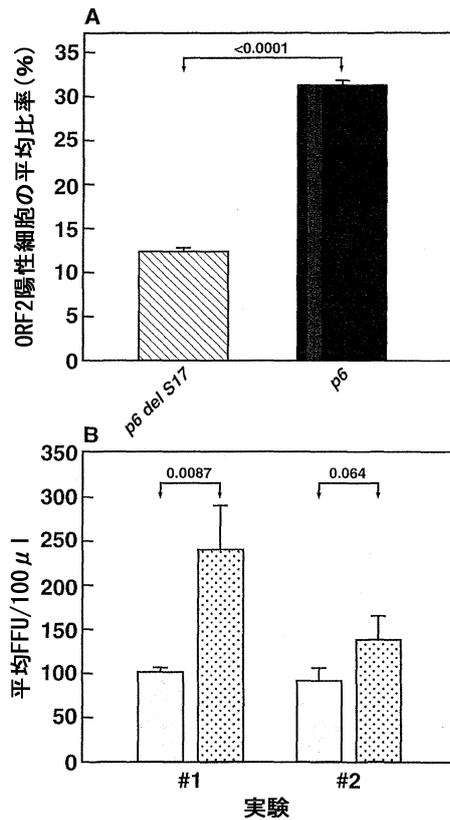
【 図 9 】



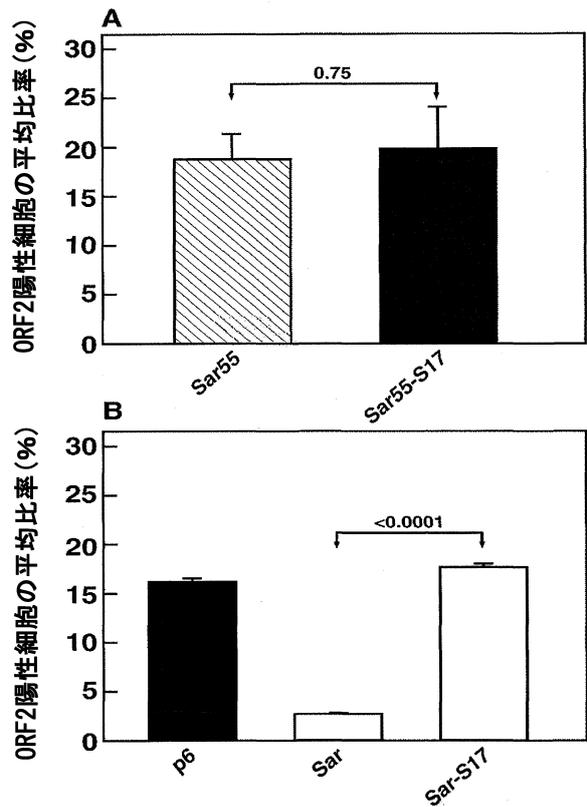
【 図 10 】



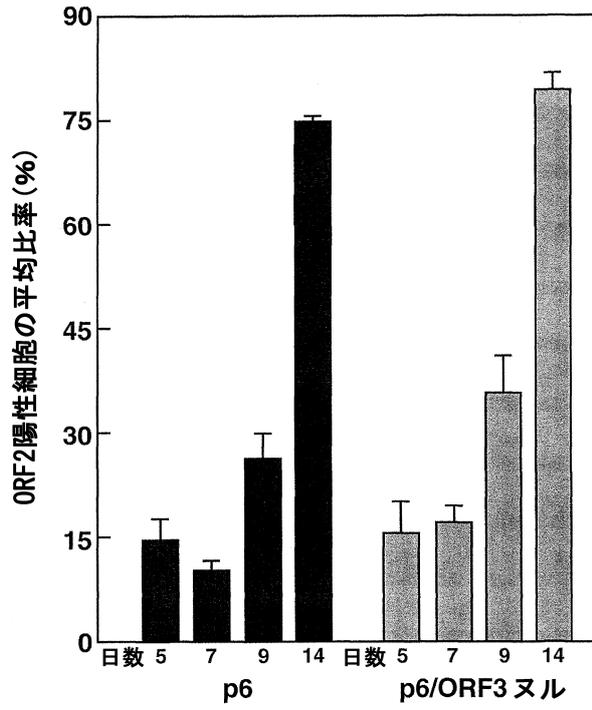
【 図 11 】



【 図 12 】



【図13】



【配列表】

0006129748000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	39/29 (2006.01)	A 6 1 K	39/29
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16
C 1 2 N	7/04 (2006.01)	C 1 2 N	7/04
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68
			C
			A

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 エマーソン スザンヌ ユー .

アメリカ合衆国 メリーランド州 ゲイサズバーグ エンシャント オーク ドライブ 15608

(72)発明者 シュクラ ブリヤンカー

インド ムンバイ カンジューマーグ イースト ローダ オーラム グランディス タワー フラット 2104

(72)発明者 グエン ハン ティー .

アメリカ合衆国 メリーランド州 ランハム ティンバー レーン 4611

(72)発明者 パーセル ロバート エイチ .

アメリカ合衆国 メリーランド州 ゲイサズバーグ エンシャント オーク ドライブ 15608

(72)発明者 ダルトン ハリー アール .

英国 コーンウォール州 ボドミン ウィジエル ウィジエル ハウス

(72)発明者 ベンドール リチャード ピー .

英国 コーンウォール州 セント アグネス グルーン ベレア カイ ピン

審査官 福間 信子

(56)参考文献 ウイルス, 2010, vol.60, no.1, p.93-104

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 90

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)