

明 細 書

発明の名称：

温度感受性のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターおよびそのRNAゲノム

技術分野

[0001] 本発明は、温度感受性のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターおよびそのRNAゲノムに関する。

背景技術

[0002] センダイウイルスなどのマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターは、細胞質型RNAウイルスベクターとして知られ、核を傷つける心配が少ないことから、再生医療やインビボでの使用において有利であると考えられている。また、センダイウイルスなどのマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターは、インビボおよびインビトロのいずれにおいても高い遺伝子導入効率、および／または遺伝子発現効率を示す場合があり、特に遺伝子導入および／または遺伝子発現の目的で有益であると考えられ、開発が活発に進められている。

[0003] ウイルスまたはウイルスベクターの使用の安全性を高めるために、細胞内から、細胞に感染したウイルスまたはウイルスベクターを除去（例えば、量の低減や消失）する技術が求められている。ウイルスまたはウイルスベクターを除去する技術として、温度感受性の変異体が作製されている。具体的にはPタンパク質にL511F変異を含むもの、あるいは、D433A／R434A／K437A変異を有するものが提案されている（特許文献1～4）。また、Lタンパク質にN1197S／L1558I／K1796Eを導入して温度感受性を高める手法が提案されている。（特許文献3および4）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：WO2012/029770

特許文献2：WO2010/008054

特許文献3：WO2017/082174

特許文献4：WO2003/025570

非特許文献

[0005] 非特許文献1：PNAS, 108(34) : 14234-14239, 2011

発明の概要

[0006] 本発明によれば、温度感受性のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターおよびそのRNAゲノムが提供される。本発明によれば、培養の温度条件によりウイルスまたはウイルスベクター感染細胞を当該感染を維持したまま培養し、その後、ウイルスまたはウイルスベクターを除去（低減）することができる。

[0007] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

[1] マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムであって、

ウイルスゲノムにコードされるPタンパク質は、D433、R434、およびK437のいずれか1以上またはすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異を含み、L511に対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異をさらに有していてもよく、L511の置換変異は、YまたはFへの変異である、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[2] 上記[1]に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、ウイルスゲノムにコードされる前記Pタンパク質は、D433、R434、およびK437のすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異を含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[3] 上記[2]に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクタ

一であって、置換変異は、TまたはSへの変異である、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[4] 上記[3]に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター一であって、置換変異は、Tへの変異である、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[5] 上記[3]に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター一であって、置換変異は、Sへの変異である、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[6] 上記[1]～[3]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、ウイルスゲノムにコードされる前記Pタンパク質が、

(1S) D433S、R434A、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(2S) D433S、R434A、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(3S) D433A、R434S、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(4S) D433A、R434S、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(5S) D433A、R434A、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(6S) D433A、R434A、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(7S) D433S、R434S、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(8S) D433S、R434S、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(9S) D433S、R434A、K437S、およびL511Fに対応す

るアミノ酸の変異を有する、

(10S) D433S、R434A、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(11S) D433A、R434S、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(12S) D433A、R434S、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(13S) D433S、R434S、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(14S) D433S、R434S、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(1T) D433T、R434A、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(2T) D433T、R434A、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(3T) D433A、R434T、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(4T) D433A、R434T、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(5T) D433A、R434A、K437T、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(6T) D433A、R434A、K437T、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(7T) D433T、R434T、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(8T) D433T、R434T、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(9T) D433T、R434A、K437T、およびL511Fに対応する

るアミノ酸の変異を有する、

(10T) D433T、R434A、K437T、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(11T) D433A、R434T、K437T、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(12T) D433A、R434T、K437T、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(13T) D433T、R434T、K437T、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(14T) D433T、R434T、K437T、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(1ST) D433S、R434T、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、または

(2ST) D433S、R434T、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNA。

[7] 上記[1]～[6]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、ラージタンパク質(Lタンパク質)が、L1361CおよびL1558Iのいずれかまたは両方にアミノ酸に対応するアミノ酸の変異を有する、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNA。

[8] 外来性の目的遺伝子を少なくとも1以上搭載した、上記[1]～[7]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNA。

[9] センダイウイルスまたはセンダイウイルスベクターである、上記[1]～[8]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNA。

[10] 上記[1]～[9]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルス

またはウイルスベクターのゲノムRNAをコードする核酸 {好ましくは、DNA、より好ましくは、当該ゲノムRNAの発現ベクター（特に、プラスミド等）}。

[11] 上記[1]～[9]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのゲノムRNAを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。[12] ゲノム上にコードされるPタンパク質よりも温度感受性が弱いPタンパク質か、温度感受性を有しないPタンパク質を含む、上記[11]に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

[13] ウイルスゲノム上にコードされるLタンパク質が温度感受性を有する場合には、ゲノム上にコードされるLタンパク質よりも温度感受性が弱いLタンパク質を含むか、または温度感受性を有しないLタンパク質を含む、上記[11]または[12]に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

[14] 上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを含む、組成物。

[15] 細胞に目的遺伝子を発現させる方法、目的遺伝子を発現した細胞を製造する方法、または、細胞を培養する方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることと、

その後、第二の温度条件下でさらに培養し、これによりマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターの一部またはすべてを前記細胞内から除去することを含む、

方法。

[0008] [16] 細胞に目的遺伝子を発現させる方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下

で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることと、

その後、第二の温度条件下でさらに培養し、これによりマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターの一部またはすべてを前記細胞内から除去することを含む、

方法。

[17] 目的遺伝子を発現した細胞を製造する方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることと、

その後、第二の温度条件下でさらに培養し、これによりマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターの一部またはすべてを前記細胞内から除去することを含む、

方法。

[18] 細胞を培養する方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることと、

その後、第二の温度条件下でさらに培養し、これによりマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターの一部またはすべてを前記細胞内から除去することを含む、

方法。

[0009] [19] 細胞に目的遺伝子を発現させる方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることを含む、

方法。

[20] 目的遺伝子を発現した細胞を製造する方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNA

ウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることを含む、

方法。

[21] 細胞を培養する方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることを含む、

方法。

[0010] [22] 細胞に目的遺伝子を発現させる方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第二の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させること（および好ましくは前記ウイルスまたはウイルスベクターを細胞内から除去すること）を含む、

方法。

[23] 目的遺伝子を発現した細胞を製造する方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたは

ウイルスベクターを感染させて、その後、第二の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させること（および好ましくは前記ウイルスまたはウイルスベクターを細胞内から除去すること）を含む、

方法。

[24] 細胞を培養する方法であって、

当該細胞に上記[11]～[13]のいずれかに記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第二の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させること（および好ましくは前記ウイルスまたはウイルスベクターを細胞内から除去すること）を含む、

方法。

[0011] [25] マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターが、センダイウ

イルスである、上記いずれかに記載の発明。

[26] マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターが、RNAゲノムと、Nタンパク質、Pタンパク質、Mタンパク質、Fタンパク質、HNタンパク質、およびLタンパク質のすべてを有する、上記いずれかに記載の発明 {ここで、RNAゲノムは好ましくは機能的なFタンパク質をコードする遺伝子を有しないことが好ましい}。

[0012] [101] 配列番号18に記載のアミノ酸配列に対して、4I、18K、36L、50I、57K、59F、63A、68L、90V、98I、および105Rからなる群から選択される1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、またはすべてのアミノ酸変異に対応するアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を有する、分解誘導性タンパク質、好ましくはFKBP12由来の分解誘導性タンパク質。

[102] 配列番号18に記載のアミノ酸配列に対して、4I、18K、50I、57K、59F、63A、68L、90V、98I、および105Rからなる群から選択される1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、またはすべてのアミノ酸変異と36L（並びに、好ましくは90Vおよび／または106P）に対応するアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を有する、分解誘導性タンパク質、好ましくはFKBP12由来の分解誘導性タンパク質。

[103] 配列番号18に記載のアミノ酸配列に対して、4I、18K、36L、50I、57K、59F、63A、68L、90V、98I、および105Rのすべてに対応するアミノ酸変異を有する、上記[101]または[102]に記載の分解誘導性タンパク質。

[104] 目的タンパク質と上記[101]～[103]のいずれかに記載の分解誘導性タンパク質を含む、分解誘導性融合タンパク質。

[105] 上記[101]～[104]のいずれかに記載のタンパク質をコードする核酸（例えば、DNAまたはRNA）。

[106] 上記[101]～[103]のいずれかに記載のタンパク質をコ

ードする核酸に対するアンチセンスオリゴ {好ましくは、上記アミノ酸変異の1以上をコードする核酸に対するアンチセンス部分を含む}。

[107] 上記[101]～[103]のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

[108] 上記[101]～[103]のいずれかに記載のタンパク質に対して、配列番号18に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対するよりも強い結合親和性で結合する、抗体。

[109] 上記[101]～[103]のいずれかに記載のタンパク質に対して、配列番号18に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対するよりも2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、100倍以上、1,000倍以上、または10,000倍以上強い結合親和性で結合する、抗体 {好ましくは、単離されていてもよい、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体}。

[110] 上記タンパク質のいずれかを含む動物細胞。

[111] 上記核酸のいずれかを含む動物細胞。

[112] 上記タンパク質のいずれかを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクター。

[113] 上記核酸のいずれかを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクター。

[114] 上記核酸のいずれかを含む、上記[113]に記載のウイルスまたはベクターのマイナス鎖RNAゲノム。

[115] 上記[114]に記載のゲノムをコードする核酸、または当該核酸を含むベクター。

[0013] [131] 配列番号20に記載のアミノ酸配列を有する、Mタンパク質。

[132] 上記[131]に記載のMタンパク質をコードする核酸。

[133] 配列番号21に記載のアミノ酸配列を有する、HNタンパク質。

[134] 上記[133]に記載のHNタンパク質をコードする核酸。

[135] 上記[131]に記載のMタンパク質、および／または上記[1

33]に記載のHNタンパク質を含む、動物細胞。

[136] 上記[131]に記載のMタンパク質、および上記[133]に記載のHNタンパク質を含む、動物細胞。

[137] 上記[131]に記載のMタンパク質、および／または上記[133]に記載のHNタンパク質を含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクター。

[138] 上記[137]に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはベクターをコードする核酸、または、核酸を含むベクター。

[139] 上記[132] および／または[134]に記載の核酸を含む、動物細胞。

[140] 上記[132] および／または[134]に記載の核酸を含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクターのゲノム（マイナス鎖RNAゲノム）。

[141] 上記[140]のゲノムを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクター。

図面の簡単な説明

[0014] [図1A]図1Aは、Pタンパク質の各種温度感受性変異体の温度感受性を示す、当該変異体感染細胞の蛍光顕微鏡写真である。

[図1B]図1Bは、Pタンパク質の各種温度感受性変異体の温度感受性を示す、当該変異体感染細胞からの相対蛍光強度である。

[図2]図2は、Pタンパク質の各種温度感受性変異体の温度感受性を示す、当該変異体感染細胞からの相対蛍光強度である。

[図3]図3は、Pタンパク質の各種温度感受性変異体の温度感受性を示す、当該変異体感染細胞からの相対蛍光強度である。

[図4]図4は、Pタンパク質およびLタンパク質に変異を有する各種温度感受性変異体の温度感受性を示す、当該変異体感染細胞からの相対蛍光強度である。

[図5A]図5Aは、Pタンパク質およびLタンパク質に変異を有する各種温度

感受性変異体の温度感受性を示す、当該変異体感染細胞からの相対蛍光強度である。

[図5B]図5Bは、L m 1 5 5 8 I を有する各種変異体をパッケージング細胞から得られたPタンパク質およびLタンパク質に変異を有する各種温度感受性変異体の温度感受性を示す、当該変異体感染細胞からの相対蛍光強度である。

[図6]図6は、温度感受性ベクターにより細胞増殖因子を導入された細胞の増殖が促進していることを示すグラフである。

[図7A]図7Aは、温度感受性ベクターにより細胞リプログラミング因子を導入された細胞において多能性マーカーであるN A N O Gの発現を示す、蛍光顕微鏡写真である。

[図7B]図7Bは、リプログラミング因子が導入された線維芽細胞の導入21日後および28日後の顕微鏡像を示す。細胞の培養は37℃にて実施された。GFP (m E m e r a l d) は、S e Vゲノムにコードされており、GFP強度はS e Vゲノムの細胞内存在量を示す。

[図8]図8は、D D r s タグによるE m G F Pの安定化の効果を示す。

[図9A]図9Aは、分解誘導性タンパク質であるD Dの変異体D D mによる、分解促進因子 (d T A G - 1 3) 非存在下での温度感受性ベクターの細胞内からの除去能力を示す。

[図9B]図9Bは、分解誘導性タンパク質であるD Dの変異体D D mによる、分解促進因子 (d T A G - 1 3) 存在下での温度感受性ベクターの細胞内からの除去能力を示す。

[図10]図10は、ウイルスベクターの感染による細胞傷害性に対するMタンパク質への変異の導入、およびHNタンパク質への変異の導入の影響を示す。縦軸は、E m G F Pの蛍光強度を示す。S e VゲノムにE m G F Pがコードされている。本実験では、対照 (C o n t r o l) では、細胞の剥離と蛍光陽性細胞の減少を伴っており、E m G F Pの強度は、生細胞数を反映する。

[図11A]図11Aは、パッケージング細胞作製用のFタンパク質導入ベクターの構造を示す。

[図11B]図11Bは、図11AのベクターとCreリコンビナーゼをコードする核酸を発現するSeVを導入した細胞（LLC-MK2細胞とVerob細胞）におけるSeVベクターの産生（すなわち、Fタンパク質の機能的な導入の成功）と、産生されたSeVベクターの温度感受性を利用した細胞からの除去を示す。

[図12]図12は、ヒトFKBP12由来の脱安定化ドメイン（DD）に対応する各動物種のFKBP12のドメインのアラインメントを示す。

発明の具体的な説明

[0015] 本明細書では、「マイナス鎖RNAウイルスベクター」とは、マイナス鎖RNAをゲノムとして有するウイルス（すなわち、マイナス鎖RNAウイルス）を目的遺伝子導入用に改変して得られた組換えウイルスである。マイナス鎖RNAウイルスとしては、オルソミクソウイルス科（インフルエンザウイルスなどのオルソミクソウイルス）、パラミクソウイルス科（モービリウイルス属などのパラミクソウイルス）、ラブドウイルス科（狂犬病ウイルスなどのラブドウイルス）、フィロウイルス科（エボラとマールブルグウイルスなどのフィロウイルス）、およびブニavirus科（ハンタウイルスなどのブニavirus）が挙げられる。パラミクソウイルスとしては、オルソパラミクソウイルス亜科のウイルスが挙げられる。オルソパラミクソウイルス亜科のウイルスとしては、レスピロウイルス属のウイルス、例えば、センダイウイルスが挙げられる。すべての態様において、マイナス鎖RNAウイルスおよびマイナス鎖RNAウイルスベクターは、好ましくは、センダイウイルス（マウスパラインフルエンザ1型ウイルスともいう）またはセンダイウイルスベクターである。

[0016] 本明細書では「パッケージング細胞」とは、ウイルスベクターを産生させる細胞である。一般的には、安全性の向上の観点で、ウイルスベクターのウイルスゲノムは、その増殖、複製、および拡散（他の細胞への感染を含む）

からなる群から選択される1以上の機能を担う因子が破壊されており、細胞感染後に増殖したり、複製したり、または拡散することができないようにエンジニアリングされている。しかし、ウイルスベクターを産生させるときには、その増殖、複製、および拡散を可能とするために、パッケージング細胞に破壊された因子を補いながらウイルスベクターを産生する。このため、パッケージング細胞は、ウイルスベクターを産生させるために、破壊されたウイルスの因子を補完して、ウイルスの産生量が回復するように、破壊されたウイルスの因子の一部を発現する。パッケージング細胞は、そのような因子をゲノム中に安定的に保有していてもよいし、一時的に保有してもよい。いずれの場合でもウイルス産生中には、補完されるウイルス性因子がパッケージング細胞の細胞内に供給される。一例として、例えば、センダイウイルスベクターは、古典的に、F遺伝子を欠損したゲノムを有するセンダイウイルスを、F遺伝子を供給するパッケージング細胞を用いて産生されることにより得られる。供給されるF遺伝子は、トリプシン存在下で活性化するが、細胞内に普遍的に存在するf u r i nで活性化するタイプのF遺伝子(F5R)なども開発され、ウイルス製造の利便性が高められている(例えば、W02005/071085A参照)。近年では、cDNAからセンダイウイルスを産生させる技術が開発されている。例えば、弱毒株であるZ株を基本骨格として、ヒトへの医療応用のために安全性をさらに高める工夫がなされたベクターが作製されている。例えば、ウイルスゲノムからM、F、およびHN遺伝子のうちのいずれか1以上を欠失させ、ウイルスの伝播性を喪失させる技術が開発されている。例えば、F遺伝子欠失ウイルスゲノムが好ましく用いられている。ウイルスゲノムは、制御配列(例えば、T7プロモーター)に作動可能に連結しており、上記制御配列によってウイルスゲノムの産生を駆動することができる。これにより、cDNAからセンダイウイルスゲノムをパッケージング細胞内で産生させることができる。第1の制御配列としてT7プロモーターを用いる場合には、T7RNAポリメラーゼは、例えば、ワクシニアウイルスなどのヘルパーウイルスにより供給され得る。パッケージング細胞内に

は、RNAポリメラーゼ（例えば、p o l l l）による転写を駆動する制御配列に作動可能に連結されたN、P、F、およびLを発現させ、これによってウイルス粒子成分を供給して、パッケージング細胞内でウイルス粒子を形成させることができる。パッケージング細胞としては、例えば、サル腎由来のLLC-MK2細胞が用いられている。これにより、一度は細胞に感染可能であるが、その後は他の細胞に伝播できないウイルス粒子が得られる。ウイルス粒子は必要に応じて濃縮および/または精製してから用いられ得る。ウイルスに外来遺伝子を組込む場合には、RNA依存性RNAポリメラーゼによる転写を可能とするためにウイルス独自の制御配列を必要に応じて導入する。

[0017] 本発明によれば、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターを製造する方法が提供される。マイナス鎖RNAウイルスとしては、オルソミクソウイルス科（インフルエンザウイルスなどのオルソミクソウイルス）、パラミクソウイルス科（モービリウイルス属などのパラミクソウイルス）、ラブドウイルス科（狂犬病ウイルスなどのラブドウイルス）、フィロウイルス科（エボラとマールブルグウイルスなどのフィロウイルス）、およびブニavirus科（ハンタウイルスなどのブニavirus）が挙げられる。マイナス鎖RNAウイルスとしては、好ましくは、パラミクソウイルス科のウイルスであり、好ましくは、パラミクソウイルスであり、好ましくは、センダイウイルスであり得る。

[0018] センダイウイルスを例示して、マイナス鎖RNAウイルスまたはマイナス鎖RNAウイルスベクターの構成を説明する。センダイウイルスは、マイナス鎖RNAゲノムと、ヌクレオタンパク質（Nタンパク質）、ホスホタンパク質（Pタンパク質）、マトリックスタンパク質（Mタンパク質）、融合タンパク質（Fタンパク質）、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ（HNタンパク質）、およびラージタンパク質（Lタンパク質）を含む。Nタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質は、RNAゲノムとRNP複合体を形成することができ、Mタンパク質、Fタンパク質、およびHNタンパク質は

、ウイルス粒子の外殻を構成することができる。前記ゲノムは、前記外殻に内包されていると考えられている。センダイウイルスは、Fタンパク質を用いて細胞に感染することができる。外殻は、Fタンパク質を有するように構築し、ゲノムはFタンパク質を生産できないように改変（欠失等）することによって、感染後にゲノムから増えるセンダイウイルスはFタンパク質を欠いているために更なる伝搬はできない。なお、ヌクレオタンパク質（Nタンパク質）、ホスホタンパク質（Pタンパク質）、およびラージタンパク質（Lタンパク質）は、導入細胞内でのウイルスゲノムまたはベクターゲノムの自律的複製に必要であるとされている。ホスホタンパク質（Pタンパク質）としては、例えば、GenBank accession番号BAN84668.1, AAB06197.1, P04859.1, P14252.1, AAB06291.1, AAX07439.1, BAM62828.1, BAM62834.1, P04860.1, BAM62840.1, BAD74220.1, P14251.1, BAM62844.1, BAM62842.1, BAF73480.1, BAD74226.1, BAF73486.1, Q9DUE2.1, BAC79134.1, NP_056873.1, およびABB00297.1の下で登録されたアミノ酸配列を有するPタンパク質が挙げられる。ある好ましい態様では、ホスホタンパク質（Pタンパク質）としては、例えば、GenBank accession番号BAN84668.1（配列番号1）に記載のPタンパク質のアミノ酸配列、または当該配列に対応する配列を有するPタンパク質が挙げられる。ラージタンパク質（Lタンパク質）としては、例えば、GenBank accession番号BAN84672.1（配列番号5）に記載のアミノ酸配列、または当該配列に対応する配列を有するLタンパク質が挙げられる。センダイウイルスのPタンパク質は、上記Pタンパク質のいずれかのアミノ酸配列をに対応するアミノ酸配列を有し得る。本明細書で参照されるPタンパク質のアミノ酸番号は、配列番号1のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号である。当業者であれば、他のアミノ

酸配列を有するPタンパク質においても、アミノ酸配列同士をアラインメントする等により、当該アミノ酸番号のアミノ酸に対応するアミノ酸を特定することができるであろう。センダイウイルスのLタンパク質は、上記Lタンパク質のアミノ酸配列と対応するアミノ酸配列を有する。本明細書で参照されるLタンパク質のアミノ酸番号は、配列番号5のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号である。当業者であれば、他のアミノ酸配列を有するLタンパク質においても、アミノ酸配列同士をアラインメントする等により、当該アミノ酸番号のアミノ酸に対応するアミノ酸を特定することができるであろう。

[0019] 本明細書では、「制御配列」は、それに作動可能に連結された遺伝子を駆動し、当該遺伝子からRNAを転写する活性を有する配列をいう。制御配列は、例えば、プロモーターである。プロモーターは、例えば、クラスIプロモーター（rRNA前駆体の転写に用いられ得る）、クラスIIプロモーター（コアプロモーターと上流プロモーターエレメントから構成され、mRNAの転写に用いられ得る）、およびクラスIIIプロモーター（I型、II型、およびIII型にさらに大別される）が挙げられる。

[0020] マイナス鎖RNAウイルスベクターは、ある態様では、そのゲノム上では、マイナス鎖RNAウイルスの細胞への増殖または感染に関する因子が破壊（例えば、欠失）されており、パッケージング細胞以外の細胞内では増殖または感染能力が低下しているか、実質的な感染能力を有しない。上述の通り、そのようなベクターは、パッケージング細胞に破壊された増殖または感染に関する因子を供給した条件下で作製することで、細胞への最初の感染能力を付与される。これにより、パッケージング細胞から得られたベクターは感染能力を有するが、その後、パッケージング細胞以外の細胞に感染したベクターは、それ以上の感染性の粒子を生み出すことができず、これによりベクターの安全性が向上させられている。

[0021] 本明細書では、「外来性」は、宿主以外の生物に由来することを意味する。典型的には、制御配列は、外来性であり得る。また、発現させる遺伝子も外来性であり得る。したがって、制御配列に作動可能に連結された遺伝子は

、制御配列および当該遺伝子の両方が外来性であり得る。「内因性」は、宿主自体が有するものであることを意味する。

[0022] 本明細書では、「タンパク質Aのあるアミノ酸に対応する」とは、タンパク質Aのホモログ、またはオースログにおいて、アラインメントしたときにタンパク質Aの当該あるアミノ酸に対応する位置に存在することを意味する。

[0023] <本発明のウイルスまたはウイルスベクターおよびそのRNAゲノム>

本発明によれば、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターおよびそのRNAゲノムが提供される。本発明によれば、マイナス鎖RNAウイルスは、好ましくは、モノネガウイルスであり得、より好ましくは、パラミクソウイルス科のウイルスであり得、さらに好ましくは、パラミクソウイルス科レスピロウイルス属のウイルスであり得、最も好ましくはセンダイウイルスであり得る。そして、本発明では、これらのウイルスから作成されたウイルスベクターが提供され得る。

上記ウイルスまたはウイルスベクターは、マイナス鎖RNAゲノム（以下、単に「ウイルスゲノム」ということがある）と、ヌクレオタンパク質（Nタンパク質）、ホスホタンパク質（Pタンパク質）、マトリックスタンパク質（Mタンパク質）、融合タンパク質（Fタンパク質）、ヘマグルチニンノイラミニダーゼ（HNタンパク質）、およびラージタンパク質（Lタンパク質）を含み得る。上記ウイルスまたはウイルスベクターは、Nタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質、並びにウイルスゲノムまたはウイルスベクターゲノムを含むRNP複合体を有し得る。上記ウイルスまたはウイルスベクターはまた、Mタンパク質、Fタンパク質、およびHNタンパク質を含むウイルス粒子の外殻を有し得る。

本発明のある態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、少なくともPタンパク質を有する。この態様では、Pタンパク質は、RNP複合体に含まれていることが好ましい。また、この態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、Mタンパク質、Fタンパク質、およびHNタンパ

ク質を含むウイルス粒子の外殻を有していることが好ましい。

[0024] これまでの研究では、Pタンパク質をPタンパク質変異体に置き換えて作製されたセンダイウイルスまたはセンダイウイルスベクターが温度感受性を示すことが明らかにされている。具体的には、L 5 1 1 F 変異およびD 4 3 3 A / R 4 3 4 A / K 4 3 7 A 変異を全て含むPタンパク質変異体（配列番号2）が、温度感受性変異であり、温度を上昇させることで当該Pタンパク質変異体を有するウイルスまたはウイルスベクターの細胞内から除去されることが示されている（WO 2 0 1 0 / 0 0 8 0 5 4、2 0 1 7 / 0 8 2 1 7 4）。

[0025] 以下、Pタンパク質の温度感受性変異体と、Lタンパク質の温度感受性変異体について説明するが、これらの変異体は、ウイルスゲノムにコードされるPタンパク質およびLタンパク質に関する記載である。これに対して、当該ウイルスゲノムを有するウイルスまたはウイルスベクターの構成タンパク質としてのPタンパク質およびLタンパク質の温度感受性の有無は問われない。すなわち、標的細胞に感染した後は、ウイルスゲノムから翻訳されるタンパク質を用いてウイルスまたはウイルスベクターが細胞内で増幅するが、その細胞内で増幅するウイルスおよびウイルスベクターのPタンパク質および好ましくはLタンパク質が温度感受性を有してさえいれば、本発明の所期の効果を奏することとなる。

[0026] したがって、ある態様では、当該ウイルスゲノムを有するウイルスまたはウイルスベクターのPタンパク質およびLタンパク質は、ウイルスゲノムにコードされるPタンパク質およびLタンパク質の温度感受性変異体よりも弱い温度感受性を有するものであってもよく、好ましくは、温度感受性を有しない（例えば、野生型と同等の温度感受性を有する）。このように構成することにより、パッケージング細胞の培養温度におけるウイルスまたはウイルスベクターの産生量低下が生じにくくなり、ウイルスまたはウイルスベクター産生効率を高めることが期待できる。また、ある態様では、当該ウイルスゲノムを有するウイルスまたはウイルスベクターのタンパク質成分としての

Pタンパク質およびLタンパク質は、下記に説明されるPタンパク質の温度感受性変異体と、好ましくはLタンパク質の温度感受性変異体を有していてもよい。ある特定温度における温度感受性の有無および強さについては、当該特定温度における培養後のウイルスまたはウイルスベクターの量に基づいて判定することができるであろう。

[0027] Pタンパク質の温度感受性変異体と、Lタンパク質の温度感受性変異体について説明する。本発明では、ウイルスゲノムにコードされるPタンパク質は、温度感受性変異を有し、ウイルスまたはウイルスベクターに温度感受性を付与することができる。ウイルスまたはウイルスベクターの温度感受性は、本発明では、ウイルスゲノム上にそれに対応する温度感受性の変異を有しないウイルスまたはウイルスベクターと比較して、特定温度領域においてその増殖が有意に低下する、その量が有意に減少する、またはその量が検出限界以下に達するものである。特定温度領域は、細胞の増殖が阻害されない温度である限り限定されないが、例えば、約35℃～約39℃であり、好ましくは、36℃～38.5℃である。本発明のある態様では、Pタンパク質は、D433、R434、およびK437のいずれか1以上またはすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有するが、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異を含む。すなわち、発明のある態様では、Pタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列を有する（但し、配列番号1および2を除く）。このようにすることで、Pタンパク質変異体は、センダイウイルスまたはセンダイウイルスベクターに温度感受性を付与することができる。本発明の好ましい態様では、Pタンパク質変異体は、D433A/R434A/K437A変異を含むPタンパク質変異体よりも、高い温度感受性を示すことができる。

[0028] 本発明のある態様では、Pタンパク質は、D433、R434、およびK437のすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異を含む。本発明のある態様では、Pタンパク質は、D433、R434、およびK437のすべてに対応す

るPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異である。本発明のある態様では、Pタンパク質は、D433、R434、およびK437のすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、Tへの変異である。本発明のある態様では、Pタンパク質は、D433、R434、およびK437のすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、Sへの変異である。

[0029] 本発明のある態様では、Pタンパク質は、L511に対応するアミノ酸配列に置換変異を有していてもよい。本発明のある態様では、L511に対応するLタンパク質のアミノ酸配列がFまたはYに変異していることが好ましい。例えば、Pタンパク質は、配列番号3に記載のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するPタンパク質変異体であってもよい。また、例えば、Pタンパク質は、配列番号4に記載のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するPタンパク質変異体であってもよい。

[0030] 本発明のある態様では、Pタンパク質が、D433に対応するアミノ酸にS、A、およびTからなる群から選択されるアミノ酸への変異を有し、R434に対応するアミノ酸に、S、A、およびTからなる群から選択されるアミノ酸への変異を有し、K437に対応するアミノ酸にS、A、およびTからなる群から選択されるアミノ酸への変異を有し、L511に対応するアミノ酸にFまたはYの変異を有しうる。また、本発明のある態様では、Pタンパク質が、

(1S) D433S、R434A、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(2S) D433S、R434A、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(3S) D433A、R434S、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(4S) D433A、R434S、K437A、およびL511Yに対応する

るアミノ酸の変異を有する、

(5S) D433A、R434A、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(6S) D433A、R434A、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(7S) D433S、R434S、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(8S) D433S、R434S、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(9S) D433S、R434A、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(10S) D433S、R434A、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(11S) D433A、R434S、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(12S) D433A、R434S、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(13S) D433S、R434S、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(14S) D433S、R434S、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(1T) D433T、R434A、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(2T) D433T、R434A、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(3T) D433A、R434T、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(4T) D433A、R434T、K437A、およびL511Yに対応する

るアミノ酸の変異を有する、

(5T) D433A、R434A、K437T、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(6T) D433A、R434A、K437T、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(7T) D433T、R434T、K437A、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(8T) D433T、R434T、K437A、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(9T) D433T、R434A、K437T、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(10T) D433T、R434A、K437T、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(11T) D433A、R434T、K437T、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(12T) D433A、R434T、K437T、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(13T) D433T、R434T、K437T、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、

(14T) D433T、R434T、K437T、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有する、

(1ST) D433S、R434T、K437S、およびL511Fに対応するアミノ酸の変異を有する、または

(2ST) D433S、R434T、K437S、およびL511Yに対応するアミノ酸の変異を有することが好ましい。

[0031] 本発明のある態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、少なくともPタンパク質とLタンパク質をコードする遺伝子を有する。RNAゲノムにコードされるPタンパク質は、上記のいずれかの変異を有する。また、

RNAゲノムにコードされるLタンパク質は、温度感受性変異を有し、ウイルスまたはウイルスベクターに温度感受性を付与することができてよい。ウイルスまたはウイルスベクターの温度感受性は、本発明では、それに対応する温度感受性の変異を有しないウイルスまたはウイルスベクターと比較して、特定温度領域においてその増殖が有意に低下する、その量が有意に減少する、またはその量が検出限界以下に達するものである。ある態様では、N1197、L1361、L1558およびK1796の1以上またはすべてに対応するアミノ酸に置換変異を有することが好ましい。N1197に対応するアミノ酸の変異は、例えば、Sへの変異であることが好ましい。L1361に対応するアミノ酸の変異は、例えば、Cへの変異であることが好ましい。また、L1558に対応するアミノ酸の変異は、例えば、Iへの変異であることが好ましい。また、K1796に対応するアミノ酸変異は、例えば、Eへの変異であることが好ましい。したがって、ある態様では、Lタンパク質は、N1197、L1361C、L1558IおよびK1796のいずれか1以上またはすべて（好ましくはすべて）を有していることが好ましい。ある態様では、N1197S、L1558I、およびK1796Eのいずれか、または好ましくはすべての変異を有することが好ましく、より好ましくは、L1361Cをさらに有していることが好ましい。すなわち、発明のある態様では、Lタンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列を有する（但し、配列番号5を除く）。

[0032] したがって、本発明のある態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、少なくともPタンパク質とLタンパク質をコードする遺伝子を有し、RNAゲノムにコードされるPタンパク質は上記のいずれかの変異を有し、かつRNAゲノムにコードされるLタンパク質は、上記いずれかの変異を有することが好ましい。すなわち、ある態様では、Pタンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列を有する（但し、配列番号1および2を除く）し、かつ、Lタンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列を有する（但し、配列番号5を除く）ことが好ましい。ある態様では、Pタンパク質は、D433、R43

4、およびK 4 3 7のすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異を含み、Lタンパク質は、L 1 3 6 1 CおよびL 1 5 5 8 Iのいずれかまたは両方（好ましくは両方）を有していることが好ましい。また、ある態様では、Pタンパク質は、D 4 3 3、R 4 3 4、およびK 4 3 7のすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異を含み、Pタンパク質は、L 5 1 1またはL 5 1 1に対応するアミノ酸配列に置換変異を有し、置換変異はFまたはYへの変異であり、Lタンパク質は、L 1 3 6 1 CおよびL 1 5 5 8 Iのいずれかまたは両方（好ましくは両方）を有していることが好ましい。ある態様では、Pタンパク質は、D 4 3 3、R 4 3 4、およびK 4 3 7のすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異であり、Pタンパク質は、L 5 1 1またはL 5 1 1に対応するアミノ酸配列に置換変異を有し、置換変異はFまたはYへの変異であり、Lタンパク質は、L 1 3 6 1 CおよびL 1 5 5 8 Iのいずれかまたは両方（好ましくは両方）を有していることが好ましい。ある態様では、Pタンパク質は、上記（1 S）～（1 4 S）および（1 T）～（1 4 T）および（1 S T）～（2 S T）のいずれかの変異を有し、Lタンパク質は、L 1 3 6 1 CおよびL 1 5 5 8 Iのいずれかまたは両方（好ましくは両方）を有していることが好ましい。Pタンパク質の変異は、他のタンパク質の変異と組み合わせて利用することができる。また、Lタンパク質の変異は、他のタンパク質の変異と組み合わせて利用することができる。

[0033] 本発明のある態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、Mタンパク質またはその変異体を有し得る。Mタンパク質の変異体は、G 6 9、T 1 1 6、およびA 1 8 3からなる群から選択される1～3のアミノ酸に対応するMタンパク質のアミノ酸に置換変異を有しうる。Mタンパク質の変異体は、例えば、G 6 9に対応するアミノ酸に変異を有し得、例えば、当該変異はG 6 9 Eに対応する変異でありうる。Mタンパク質の変異体は、例えば、

G 1 1 6に対応するアミノ酸に変異を有し得、例えば、当該変異は、T 1 1 6 Aに対応する変異であり得る。Mタンパク質の変異体は、例えば、A 1 8 3に対応するアミノ酸に変異を有し得、例えば、当該変異は、A 1 8 3 TまたはA 1 8 3 Sに対応する変異、好ましくはA 1 8 3 Sに対応する変異であり得る。ある態様では、Mタンパク質の変異体は、G 6 9 E、T 1 1 6 A、およびA 1 8 3 Tに対応するアミノ酸変異を有し得、または、好ましくは、G 6 9 E、T 1 1 6 A、およびA 1 8 3 Sに対応するアミノ酸変異を有しうる。Mタンパク質の変異は、S e Vの細胞毒性を低減しうる。Mタンパク質の変異は、他のタンパク質の変異と組み合わせて利用することができる。

[0034] 本発明のある態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、HNタンパク質またはその変異体を有し得る。HNタンパク質の変異体は、A 2 6 2、G 2 6 4、およびK 4 6 1からなる群から選択される1～3のアミノ酸に対応するHNタンパク質のアミノ酸に置換変異を有しうる。HNタンパク質は、例えば、A 2 6 2に対応するアミノ酸に変異を有し得、例えば、当該変異は、A 2 6 2 Tに対応する変異であり得る。HNタンパク質は、例えば、G 2 6 4に対応するアミノ酸に変異を有し得、例えば、当該変異は、G 2 6 4 RまたはG 2 6 4 Kに対応する変異、好ましくはG 2 6 4 Kに対応する変異を有しうる。HNタンパク質は、例えば、K 4 6 1に対応するアミノ酸に変異を有し得、例えば、当該変異は、K 4 6 1 Eに対応する変異であり得る。ある態様では、HNタンパク質の変異体は、A 2 6 2 T、G 2 6 4 R、およびK 4 6 1 Eに対応するアミノ酸変異を有し得、または、好ましくは、A 2 6 2 T、G 2 6 4 K、およびK 4 6 1 Eに対応するアミノ酸変異を有しうる。HNタンパク質への変異は、S e Vの細胞毒性を低減しうる。HNタンパク質の変異は、他のタンパク質の変異と組み合わせて利用することができる。

[0035] 本発明のある態様では、Pタンパク質、Lタンパク質、Mタンパク質、およびHNタンパク質は、それぞれ上記で説明される変異を有していることができる。

[0036] 上記で規定したアミノ酸置換は、当該変異後のアミノ酸についての保存的アミノ酸への置換としてもよい。例えば、非電荷極性アミノ酸への変異は、他の非電荷極性アミノ酸への変異としてもよく、また、例えば、非極性アミノ酸への変異は、他の非極性アミノ酸への変異としてもよい。

保存的置換とは、

酸性アミノ酸（アスパラギン酸（D）、およびグルタミン酸（E））の群、塩基性アミノ酸（アルギニン（R）、リジン（K）、およびヒスチジン（H））の群、

非電荷極性アミノ酸（アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、スレオニン（T）、およびチロシン（Y））の群、および

非極性アミノ酸（アラニン（A）、グリシン（G）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、プロリン（P）、フェニルアラニン（F）、メチオニン（M）、トリプトファン（W）、およびシステイン（C））の群

の各群内のアミノ酸の置換であり、非保存的置換は、保存的置換ではないアミノ酸置換を意味する。

[0037] ある態様では、ウイルスまたはウイルスベクターは、目的遺伝子（GOI）をさらに有していてもよい。RNAゲノム上のGOIの搭載位置はN遺伝子の前（以下「+」と表される）、P遺伝子とM遺伝子の間（以下「PM」と表される）、M遺伝子とHN遺伝子の間（以下「MHN」と表される）、HN遺伝子とL遺伝子の間（以下「HNL」と表される）であり、遺伝子発現量はこの搭載位置の順番にしたがって減少することが知られている。

[0038] ある態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、ヌクレオタンパク質（Nタンパク質）、ホスホタンパク質（Pタンパク質）、マトリックスタンパク質（Mタンパク質）、融合タンパク質（Fタンパク質）、ヘマグルチニンーノイラミニダーゼ（HNタンパク質）、およびラージタンパク質（Lタンパク質）をコードする遺伝子を含むゲノムを含み得る。ある態様では、機能的な融合タンパク質（Fタンパク質）をコードする遺伝子を含まず（

好ましくは当該遺伝子の欠失を有し)、ヌクレオタンパク質(Nタンパク質)、ホスホタンパク質(Pタンパク質)、マトリックスタンパク質(Mタンパク質)、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ(HNタンパク質)、およびラージタンパク質(Lタンパク質)をコードする遺伝子を含むゲノムを含み得る。本発明のすべての態様において、ゲノム上のPタンパク質をコードする遺伝子、および、必要に応じてLタンパク質をコードする遺伝子は、それぞれ、上記温度感受性変異を有していることが好ましい。このようにすることで、感染後の細胞内で増殖したウイルスまたはウイルスベクターが温度感受性の効果を発揮することができる。本発明のすべての態様において、ウイルスまたはウイルスベクター粒子上では、Pタンパク質およびLタンパク質は、温度感受性変異を有してもよいし、有していなくてもよい。ウイルスまたはウイルスベクターは、シュードタイプであってもよい。シュードタイプのウイルスまたはウイルスベクターは、エンベロープタンパク質が、変更されているものを指し、例えば、エンベロープタンパク質を他のウイルス由来のものに変更されていてもよい。これにより、ウイルスの細胞指向性(c e l l t r o p i s m)を変更することが可能となる。ある好ましい態様では、ウイルスまたはウイルスベクターのゲノムは、上記温度感受性変異を有するPタンパク質および/またはLタンパク質を有し、ウイルスまたはウイルスベクターのウイルス粒子自体は、野生型Pタンパク質、および/または野生型Lタンパク質を含んでいてもよく、さらには温度感受性Pタンパク質および温度感受性Lタンパク質を含んでいなくてもよい。

[0039] ある態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、ゲノムとヌクレオタンパク質(Nタンパク質)、ホスホタンパク質(Pタンパク質)、およびラージタンパク質(Lタンパク質)を含むRNP複合体と、マトリックスタンパク質(Mタンパク質)、融合タンパク質(Fタンパク質)、およびヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ(HNタンパク質)を含むウイルス粒子を有し、前記ウイルス粒子は、前記複合体を含む。

[0040] ある態様では、上記ウイルスまたはウイルスベクターは、制御配列に作動

可能に連結した目的遺伝子を含み得る。上記ウイルスまたはウイルスベクターは、制御配列に作動可能に連結した目的遺伝子を、感染細胞において発現させることができる。目的遺伝子は、RNAに転写され、RNAが生理活性を示すか、または、RNAを経由してタンパク質に翻訳され、タンパク質が生理活性を示し得る。「制御配列」は、それに作動可能に連結された遺伝子を駆動し、当該遺伝子からRNAを転写する活性を有する配列をいう。目的遺伝子は、ウイルスまたはウイルスベクターに対して外来性であり得る。目的遺伝子はまた、感染させる細胞に対して外来性であり得る。ここで、「外来性」は、本来その種が有しないことを意味する。制御配列は、例えば、プロモーターである。プロモーターは、例えば、クラスⅠプロモーター（rRNA前駆体の転写に用いられ得る）、クラスⅡプロモーター（コアプロモーターと上流プロモーターエレメントから構成され、mRNAの転写に用いられ得る）、およびクラスⅢプロモーター（Ⅰ型、Ⅱ型、およびⅢ型にさらに大別される）が挙げられる。

[0041] 上記ウイルスまたはウイルスベクターは、動物細胞（特に哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞）に感染することができる。上記ウイルスまたはウイルスベクターは、好ましくは、動物細胞（特に哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞）においてそのゲノムを増幅させることができる。上記ウイルスまたはウイルスベクターは、好ましくは、37℃以上、37.5℃以上、38℃以上、または38.5℃以上において温度感受性を示し得る。この温度感受性により、ウイルスまたはウイルスベクターは、細胞内から除去され得る。

[0042] 上記ウイルスまたはウイルスベクターは、通常のウイルスまたはウイルスベクターの製造方法により製造することができる。製造の際に、Pタンパク質をコードする遺伝子として上記いずれかのPタンパク質変異体をコードする遺伝子を用いることができる。また、製造の際に、Lタンパク質をコードする遺伝子として上記いずれかのLタンパク質変異体をコードする遺伝子を用いることができる。また、上記ウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムは、上記ウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムをコードす

る核酸（好ましくはDNA、より好ましくは当該核酸を含む発現プラスミド）から転写することにより得ることができる。上記ウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムをコードする領域を有する核酸は、制御配列をさらに有し、前記領域は前記制御領域に作動可能に連結されていることが好ましい。上記ウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムをコードする領域を有する核酸は、当該核酸の発現ベクターに搭載されていることが好ましい。発現ベクターとしては、特に限定されないが例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター、コスミドベクター、人工染色体などが挙げられる。発現ベクターは、制御配列に作動可能に連結されたRNAゲノムの発現カセットに加えて、自己複製起点（Ori）、ポジティブ選択マーカ遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質をコードする遺伝子など）をさらに含んでいてもよい。ウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムは、ウイルスのタンパク質成分などを供給するパッケージング細胞において製造されることが知られている。パッケージング細胞は、製造されるウイルスおよびウイルスベクター粒子に含まれる成分を供給することとなる。パッケージング細胞においては、ウイルスおよびウイルスベクター粒子は大量に産生されることが好ましく、この観点においては、パッケージング細胞に供給されるタンパク質は、本明細書に記載された温度感受性を有しないことが好ましく、例えば、野生型のタンパク質とすることが好ましい。このようにして、製造されたウイルスは、常法に基づいて力価を測定され得る。力価は、 1×10^5 CIU/mL以上、 2×10^5 CIU/mL以上、 3×10^5 CIU/mL以上、 4×10^5 CIU/mL以上、 5×10^5 CIU/mL以上、 6×10^5 CIU/mL以上、 7×10^5 CIU/mL以上、 8×10^5 CIU/mL以上、 9×10^5 CIU/mL以上、 1×10^6 CIU/mL以上、 2×10^6 CIU/mL以上、 3×10^6 CIU/mL以上、 4×10^6 CIU/mL以上、 5×10^6 CIU/mL以上、 6×10^6 CIU/mL以上、 7×10^6 CIU/mL以上、 8×10^6 CIU/mL以上、 9×10^6 CIU/mL以上、 1×10^7 CIU/mL以上、 2×10^7 CIU

／mL以上、 3×10^7 C I U／mL以上、 4×10^7 C I U／mL以上、
または 5×10^7 C I U／mL以上であり得る。

[0043] <上記ウイルスまたはウイルスベクターを感染させた細胞の培養方法>

本発明によれば、細胞にウイルスまたはウイルスベクターを感染させる方法、およびウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞の培養方法が提供される。

[0044] 本発明によれば、細胞にウイルスまたはウイルスベクターを感染させる方法は、感染に適した環境下で細胞に、上記で説明した本発明のウイルスまたはウイルスベクターを接触させることを含む。ウイルスまたはウイルスベクターに、選択マーカー遺伝子（例えば、蛍光タンパク質などの可視化マーカー遺伝子、および薬剤耐性遺伝子）を搭載することにより、当該ウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を、選択マーカー遺伝子の発現を指標として選択することができる。

[0045] 本発明によれば、本発明のウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を培養する方法が提供される。本発明のウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を培養する方法は、本発明のウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を当該細胞の維持または増殖に適した環境下で培養することを含む。本発明のウイルスまたはウイルスベクターは、当業者であれば、常法により適宜細胞に感染させることができる。本発明によれば、本発明のウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞もまた、提供され得る。

[0046] ある態様では、ウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を培養する方法は、第一の温度条件下で前記細胞を培養することを含む。ある態様では、ウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を培養する方法は、第一の温度条件下で前記細胞を培養することと、その後、第二の温度条件下で前記細胞を培養することとを含み得る。

[0047] 第一の温度条件は、当該細胞に感染したウイルスまたはウイルスベクターの維持または増殖に適した条件である。

[0048] また、第二の温度条件は、ウイルスまたはウイルスベクター量が減少また

は消失するに適した条件である。

[0049] また、第一の温度は、第二の温度よりも低い温度である。

[0050] 本発明のウイルスまたはウイルスベクターを細胞内で維持する場合には、例えば、第一の温度条件下で本発明のウイルスまたはウイルスベクターが感染した細胞を培養することができる。また、本発明のウイルスまたはウイルスベクターを減少または消失させる場合には、例えば、第二の温度条件下で本発明のウイルスまたはウイルスベクターが感染した細胞を培養することができる。本発明のウイルスまたはウイルスベクターは、感染細胞中で維持または増殖できるが、培養温度を上昇させることにより、維持または増殖を阻害し、感染細胞からウイルスまたはウイルスベクターを除去することができる。当業者であれば、適宜第一の温度、および第二の温度を決定することができるであろう。

[0051] ウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を培養する方法は、当該細胞をウイルスまたはウイルスベクターの維持または増殖に適した条件下で培養することを含み得る。維持または増殖に適した条件は、好ましくは、ウイルスまたはウイルスベクターがPタンパク質またはLタンパク質の変異による温度感受性の影響を受けない温度条件を含む。例えば、細胞内で本発明のウイルスまたはウイルスベクターの維持または増殖をさせることが必要な場合（例えば、ウイルスまたはウイルスベクターに搭載した目的遺伝子を高発現させる場合など）には、本発明のウイルスまたはウイルスベクターが維持または増殖に適した条件下で感染細胞を培養することができる。ウイルスまたはウイルスベクターがPタンパク質またはLタンパク質の変異による温度感受性の影響を受けない温度条件は、当業者であれば適宜決定することができる。例えば、37℃で温度感受性の影響を受けなければ、37℃で感染細胞を培養することができる。例えば、37℃で温度感受性の影響を受ける場合には、より低い温度、例えば、35℃以上37℃未満の温度条件下で、感染細胞を培養することができる。但し、本発明のウイルスまたはウイルスベクターを維持または増加させるに適した条件は、細胞の維持や増殖に著し

い悪影響を与えないものである。

[0052] ウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を培養する方法は、当該細胞をウイルスまたはウイルスベクター量が減少するに適した条件下で培養することを含み得る。ある態様では、ウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞を培養する方法は、当該細胞をウイルスまたはウイルスベクターの維持または増殖に適した条件下で培養し、その後、当該細胞をウイルスまたはウイルスベクター量が減少するに適した条件下で培養することを含み得る。ウイルスまたはウイルスベクター量が減少するに適した条件は、好ましくは、ウイルスまたはウイルスベクターがPタンパク質またはLタンパク質の変異による温度感受性の影響を受ける温度条件を含む。例えば、細胞内で本発明のウイルスまたはウイルスベクターを減少させることが必要な場合（例えば、ウイルスまたはウイルスベクターに搭載した目的遺伝子を発現させた後で細胞から当該ウイルスまたはウイルスベクターを除去する場合など）には、本発明のウイルスまたはウイルスベクターが減少するに適した条件下で感染細胞を培養することができる。ウイルスまたはウイルスベクターがPタンパク質またはLタンパク質の変異による温度感受性の影響を受ける温度条件は、当業者であれば適宜決定することができる。例えば、37℃で温度感受性の影響を受けなければ、37℃を超える温度（例えば、37℃を超え、39℃以下の温度、例えば、37.5℃～38.5℃）で感染細胞を培養することができる。例えば、37℃で温度感受性の影響を受ける場合には、37℃以上の温度で感染細胞を培養することができる。このようにして、温度感受性の影響を受けない、または受けにくい温度（第一の温度）で感染細胞を培養し、ウイルスまたはウイルスベクターを感染細胞から除去したいときに、培養温度を第二の温度に上昇させることができる。但し、本発明のウイルスまたはウイルスベクターが減少するに適した条件は、細胞の維持や増殖に著しい悪影響（特に回復不能な障害または損傷等）を与えないものである。このようにすることで、ウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞からウイルスまたはウイルスベクターを除去することができる。したがっ

て、ある態様では、本発明のウイルスまたはウイルスベクターに感染した細胞から、ウイルスまたはウイルスベクターを有しない細胞を得る方法が提供される。ウイルスまたはウイルスベクターを有しない細胞は、例えば、細胞内からウイルスまたはウイルスベクターのゲノムが検出されないことにより試験することができる。ゲノムの検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）等の周知技術を用いて当業者であれば適宜決定することができる。上記細胞の培養方法によれば、一過性の遺伝子導入および遺伝子発現を実現することができる。

[0053] 本発明によれば、本発明のウイルスまたはウイルスベクターを含むまたは感染した細胞の培養は、最初から第二の温度において行われてもよい。すなわち、感染細胞から本発明のウイルスまたはウイルスベクターが除去されるまでには時間を要する。したがって、除去されるまでに、細胞内でウイルスまたはウイルスベクターに搭載された遺伝子等が発現し、所期の目的を達することもできる。そのため、第一の温度による培養をせず、第二の温度による培養を行うことでもよいであろう。

[0054] 第一の温度および第二の温度は、それぞれ一定の温度範囲に含まれていればよいが、好ましくは、一定温度（±誤差範囲）の温度であり得る。一定の温度範囲は、第一の温度に関しては、ウイルスまたはウイルスベクターの維持または増殖に適した温度範囲（より高い温度領域）であり、第二の温度に関しては、ウイルスまたはウイルスベクターの除去（減少）に適した温度範囲（より低い温度領域）である。ウイルスまたはウイルスベクターの除去後に細胞をさらに維持または培養する目的では、いずれの温度範囲も、細胞の生存に著しい害をもたらすものではなく、細胞に著しい障害を生じさせるものでもない。好ましくは、いずれの温度範囲も細胞の生存に実質的な影響を及ぼさないものである。

[0055] 本発明によれば、細胞を分化誘導する方法であって、
前記細胞に本発明のウイルスまたはウイルスベクターを感染させることと、
、

その後、感染細胞を培養して、細胞を分化誘導することと、
分化誘導後に、培養温度を上昇させて、分化誘導した細胞から本発明のウイルスまたはウイルスベクターを除去することと、
を含み、前記ウイルスまたはウイルスベクターは、分化誘導因子を発現可能に搭載している、方法が提供される。分化誘導は、細胞を他の安定的な細胞状態へ分化させることを意味する。したがって、細胞を分化誘導する方法は、分化誘導した細胞を製造する方法と同義である。ある細胞を他の安定な細胞状態へ分化させる方法としては、公知の様々な方法を用いることができる。本発明のウイルスまたはウイルスベクターは、分化誘導を促進する分化誘導因子を搭載していることができる。細胞は、例えば、神経細胞、心筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、血球系細胞（白血球など）、肝細胞および膵β細胞などの体細胞へ分化誘導され得る。これらの体細胞への分化誘導は当業者に知られた方法により行うことができる。

[0056] 本発明によれば、細胞をリプログラミング（核初期化）する方法であって、
、
前記細胞に本発明のウイルスまたはウイルスベクターを感染させることと、
、
その後、感染細胞を培養して、細胞をリプログラミングすることと、
分化誘導後に、培養温度を上昇させて、リプログラミングした細胞から本発明のウイルスまたはウイルスベクターを除去することと、
を含み、前記ウイルスまたはウイルスベクターは、リプログラミング因子を発現可能に搭載している、方法が提供される。リプログラミング因子としては、特に限定されないが例えば、山中因子（OCT4、SOX2、KLF4、および必要に応じてc-MYC）、トムソン因子（OCT4、SOX2、NANOG、LIN-28）およびその他のリプログラミング因子が挙げられる。リプログラミング因子はまた、例えば、KLF4、OCT4、SOX2とMYCLであり得る。

[0057] 上記に限られず、細胞に一過性にタンパク質やRNAを発現させ、その後

、ベクターを除去することが望まれる様々な用途に本発明は用いられ得る。ゲノム編集システム（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、およびCRISPR/Casシステム（例えば、CRISPR/Cas9システム））のためのタンパク質成分および必要な場合にはRNA成分を細胞内に発現させ、必要な場合にはRNA-タンパク質複合体（RNP複合体）を形成させ、細胞のゲノム等の核酸（例えば、DNA）を編集して、編集後にベクターを除去することにも用いることができるであろう。

[0058] <デグロンを用いたウイルスまたはウイルスベクターの感染細胞からの除去>

本発明では、デグロンを用いて、感染細胞から当該細胞に感染したウイルスまたはウイルスベクターを除去することもできる。デグロンは、上記の温度感受性変異体と温度変化を活用したウイルスまたはウイルスベクターの除去と組み合わせて使用されてもよい。デグロンとしては、例えば、FKBP12結合タンパク質（FKBP12）由来のデグロン、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）由来のデグロンなどの様々なデグロンを用いることができる（US2009/0215169A参照）。これらのタンパク質の不安定化ドメイン（destabilizing domain; DD）は、分解誘導性であり、他のタンパク質（目的タンパク質）と融合させることによって、当該目的タンパク質の分解を誘導することに用いることができる。DDタグおよび分解誘導性を有するその変種は、例えば、タンパク質のN末端、またはC末端に付加することができる。

[0059] 本発明では、FKBP12由来DDは、F15S、V24A、H25R、E60G、L106P、D100G、M66T、R71G、D100N、E102G、およびK105Iからなる群から選択されるいずれかのアミノ酸変異に対応するアミノ酸変異を有していてもよい。FKBP12由来DDは、F36に対応するアミノ酸における変異、特にF36Vを有していることが好ましい。また、FKBP12由来DDは、特にL106Pを有していることが好ましい。また、FKBP12由来DDは、F36VとL106Pを

有していることが好ましい。本発明では、好ましくは、4 I、18 K、36 L、50 I、57 K、59 F、63 A、68 L、90 V、98 I、および105 Rからなる群から選択される1以上の変異を有していることが好ましく、すべての変異を有していることがより好ましい。

[0060] 本発明では、上記DDを融合したNタンパク質、Pタンパク質、Mタンパク質、Fタンパク質、HNタンパク質、およびLタンパク質、並びにこれらのいずれかをコードする遺伝子が提供される。本発明では、上記DDを融合したNタンパク質、Pタンパク質、Mタンパク質、Fタンパク質、HNタンパク質、およびLタンパク質からなる群から選択される1以上、および／またはこれらをコードする遺伝子の1以上を含む、細胞またはセンダイウイルスもしくはセンダイウイルスベクターもしくはセンダイウイルスゲノムが提供される。これらの融合タンパク質は、上記で説明される各タンパク質の代わりにその変異体を含んでいてもよい。変異体については本明細書で説明した通りである。

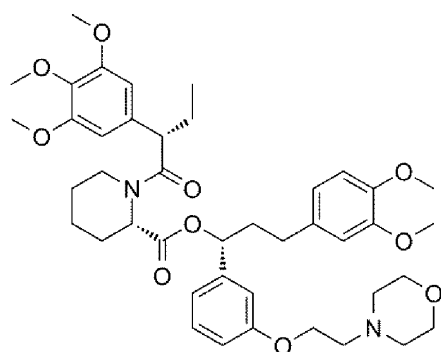
[0061] 本発明では、特に、上記DDを融合したPタンパク質および当該Pタンパク質をコードする遺伝子が提供される。本発明では、上記DDを融合したPタンパク質および／または当該Pタンパク質をコードする遺伝子を含む、細胞またはセンダイウイルスもしくはセンダイウイルスベクターもしくはセンダイウイルスゲノムが提供される。ここで、Pタンパク質の代わりに、本明細書で説明されたPタンパク質の変異体が用いられてもよい。

[0062] マイナス鎖RNAウイルスまたはベクターの細胞内での増殖に上記DDを融合したPタンパク質が必須である場合には、dTAG-13またはその誘導体などの分解促進分子の存在下で、細胞内からマイナス鎖RNAウイルスまたはベクターを除去することができる。マイナス鎖RNAウイルスまたはベクターを細胞内で維持したい場合には、Shield1またはその誘導体などの安定化分子存在下で細胞を培養することができる。このように、本発明では、分解促進分子を用いて、および好ましくは安定化分子をさらに用いて、細胞中でのウイルスまたはウイルスベクターの除去（および好ましくは

維持)を制御することができる。dTAG-13は、上記DDまたはその変異体と結合する部位とユビキチンE3リガーゼに結合する部位を有するPROTAC (Proteolysis Targeting Chimeraの略)であり、上記DDまたはその変異体の融合タンパク質の分解を誘導する。

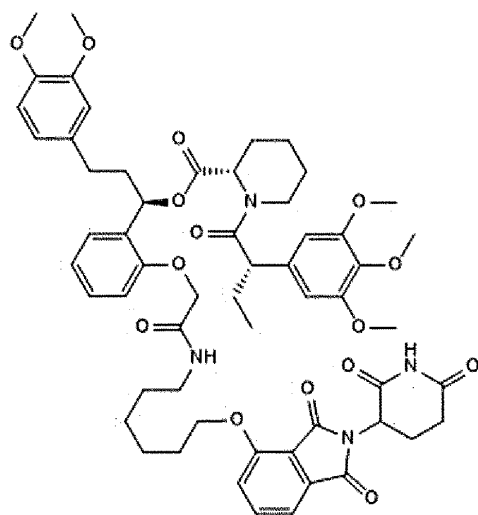
[0063] [化1]

Shield1の化学式



[0064] [化2]

dTAG-13の化学式



[0065] <パッケージング細胞およびその製造方法>

本発明では、既存のパッケージング細胞を用いてSeV等のマイナス鎖R

NAウイルスまたはベクターを作製することができる。しかし、本発明では、新たにパッケージング細胞を作製することができ、得られたパッケージング細胞を用いてウイルスまたはベクターを製造してもよい。

[0066] ある態様では、パッケージング細胞は、細胞株であり、安定的に樹立された細胞株であることが好ましい。パッケージング細胞は、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクターが感染できる種類の細胞であればよく、特に限定されないが、例えば、LLC-MK2細胞およびVero細胞であり得る。パッケージング細胞は、典型的には、Fタンパク質などのウイルスの構成要素の1以上を発現する。パッケージング細胞は、加えて、PKR阻害性の因子（例えば、VAIなど）を搭載してもよい。

[0067] パッケージング細胞は、Fタンパク質などのウイルスの構成要素の1以上をコードする遺伝子を有し、好ましくは、当該遺伝子について一定レベル以上の発現を示す。前記遺伝子は、制御配列に作動可能に連結され、当該制御配列によりその発現が駆動される。発現量は、制御配列、遺伝子が組込まれるゲノム上の位置、およびゲノムに挿入された遺伝子のコピー数などの様々な要因により決定される。高い発現量を確保するために、遺伝子導入の際に、同一プロモーター下に連結されたマーカー遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子および可視化マーカー遺伝子（例えば、蛍光タンパク質））を活用し得る。すなわち、高発現株の取得のためにまず、制御配列に、第一の部位特異的組換え配列を介して作動可能に連結されたマーカー遺伝子を有し、さらに第二の部位特異的組換え配列を介して、Fタンパク質などのウイルスの構成要素の1以上をコードする遺伝子などを連結させる。この構成において、マーカー遺伝子は、第一の部位特異的組換え配列と第二の部位特異的組換え配列の間（介在配列という）中に存在することとなる。第一の部位特異的組換え配列と第二の部位特異的組換え配列は、組換え酵素の存在下で組換えを生じ、これらの間の配列（介在配列）を除去することができる。組換え酵素により介在配列を除去した後は、前記の制御配列により、Fタンパク質などのウイルスの構成要素の1以上をコードする遺伝子などが駆動されるように設

計されている。さらに、介在配列中にはマーカー遺伝子が存在し、マーカー遺伝子の発現強度に基づいて、強くマーカー遺伝子が発現する細胞を選択することができる。マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子の場合には、一定濃度の薬剤により細胞を選択することにより、一定以上の薬剤耐性遺伝子の発現を示す細胞が選択される。マーカー遺伝子が可視化マーカーである場合には、可視化マーカーの発現強度を測定する（例えば、GFPならその蛍光強度を測定する）ことにより、一定以上の可視化マーカーの発現を示す細胞が選択される。こうして、マーカー遺伝子の発現強度が高い細胞を選択する。選択された細胞では、上記遺伝子が、遺伝子が組込まれるゲノム上の位置、およびゲノムに挿入された遺伝子のコピー数などの様々な要因により高発現していることが示唆される。選択された細胞をクローニングし、得られたクローンに対して、前記部位特異的組換え配列を認識して組換えを誘発する部位特異的組換え酵素を作用させる。すると、介在配列が除去されて、前記制御配列に作動可能にFタンパク質などのウイルスの構成要素の1以上をコードする遺伝子などが連結する。このようにして、パッケージング細胞を得ることができる。部位特異的組換え酵素は、例えば、除去可能なマイナス鎖RNAウイルスベクター、例えば、センダイウイルスベクター（例えば、温度感受性SeV）により細胞に導入することができる。部位特異的組換え酵素導入後は、当該ベクターを除去して、検出限界以下とすることにより、細胞をパッケージング細胞として好ましく利用できるようにすることができる。介在配列除去後には、1つの部位特異的組換え配列が前記制御配列と導入した遺伝子との間に残存し得る。

[0068] 部位特異的組換え酵素およびその認識配列としては、特に限定されないが、例えば、部位特異的組換え酵素であるCreリコンビナーゼ（以下、単に「Cre」ということがある）とその認識配列であるloxPの系、部位特異的組換え酵素であるFlpリコンビナーゼ（以下、単に「Flp」ということがある）とその認識配列であるFRTの系、Dreリコンビナーゼとその認識配列であるroxの系（Anastassiadis, K. et

al., Dis. Model. Mech. (2009) 2: 508-515)、並びに、 ϕ C31リコンビナーゼとその認識配列である attP/attBの系 (Belteki G et al., Nat. Biotechnol. (2003) 21: 321-324) などの部位特異的組換え反応系を用いることができる。Cre-loxP系を改良したSCre-SloxP系やVCre-VloxP系 (E. Suzuki and M. Nakayama, Nucleic Acid Res. (2011) 39 (8): e49) なども用いることができる。また、国際公開公報第2001/023545号公報に記載のFRT配列などの変異FRT配列 (例えば、FRT (f2161) およびFRT (f2262) など)、および、特開平11-196880号公報に記載のloxP配列などの変異loxP配列の配列などを用いてもよく、このような部位特異的組換え酵素の認識配列は当業者であれば自由に選択して用いることができる。

[0069] 本発明では、上記いずれかのタンパク質をコードする核酸を含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクターのゲノムが提供される。本発明では、当該ゲノムをコードする核酸、および、当該核酸を含むベクターが提供される。ベクターは、クローニングベクターおよび当該ゲノムの発現ベクターであり得る。好ましい態様では、発現ベクターは、パッケージング細胞においてゲノムを転写することができる。

実施例

[0070] 実施例1：マイナス鎖RNAウイルスベクターの調製

マイナス鎖RNAウイルスベクターをウイルスのパッケージング細胞で発現させた。特に発現の際のPタンパク質への変異導入の温度感受性を評価した。

[0071] マイナス鎖RNAウイルスベクターとしては、センダイウイルス (SeV) を用いた。センダイウイルスは、F遺伝子発現細胞にプラスミド混合物を導入し、3日後の培養上清から回収した。プラスミド混合物は、T7プロモ

ーターに作動可能に連結されたセンダイウイルスゲノムを搭載した pSeV-E mGFP を含んだ。センダイウイルスゲノムには、ゲノムの増殖を蛍光により検出できるように、EmGFP をコードする遺伝子を搭載した。センダイウイルスゲノムは、F 遺伝子の欠失を有するものとした。

[0072] (1) F 遺伝子発現細胞は以下のように作製した。

pCAGGS-neo に SeV の F 遺伝子 (コザック配列付加、ヒトコドンに最適化) を搭載し、pCAGGS-F-neo を構築した。得られたプラスミドを Vero 細胞、あるいは LLC-MK2 細胞に ViaFect (プロメガ社) を用いてトランスフェクションし、1~2 mg/mL の G418 二硫酸塩溶液 (ナカライテスク) を用いて選択し、F 遺伝子発現細胞を得た。得られた細胞は Vero-F、及び LLC-MK2-F と表記する。

[0073] (2) F 遺伝子欠失型 SeV は、以下のように作製した。

ACCESSION: AB855655 の SeV-Z 株の配列情報を基に、T7 プロモーターで F 遺伝子欠失型 SeV ゲノムが転写される pSeV/dF を構築した。SeV-Z 株の細胞傷害性を最小化するために、pSeV/dF に次のアミノ酸変異を加えた: M タンパク質: 69E、116A、及び 183S、HN タンパク質: 262T、264R、及び 461E、並びに、L タンパク質: 1197S、及び 1796E (例えば、WO2003/025570 参照)。SeV の温度感受性と除去を評価するために目的遺伝子 (GOI) として GFP の変異体である EmGFP をゲノムに搭載した。GOI の搭載位置は N 遺伝子の前 (以下「+」と表される)、P 遺伝子と M 遺伝子の間 (以下「PM」と表される)、M 遺伝子と HN 遺伝子の間 (以下「MHN」と表される)、HN 遺伝子と L 遺伝子の間 (以下「HNL」と表される) の順で遺伝子発現量が減少する。EmGFP 遺伝子の搭載位置は SeV の N 遺伝子の前である + 位を主に用いた。本実施例では、SeV ゲノム上で、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する P タンパク質の D433、R434、K437、および L511 のいずれか 1 以上に対してアミノ酸置換による変異を導入した。なお、パッケージング細胞においては、温度感受性を有す

るPタンパク質も、温度感受性を有しないPタンパク質（例えば、野生型）も用いることができるが、温度感受性を有しないPタンパク質（例えば、野生型）を用いた方がウイルスの産生効率が高かった。したがって、本実施例では、ゲノムには、温度感受性変異を有するPタンパク質をコードする遺伝子を搭載したが、パッケージング細胞には野生型Pタンパク質を発現させ、ウイルス粒子には野生型Pタンパク質を導入した。

[0074] (3) SeV再構築用のプラスミドは以下のように作製した。

WO2005/071092を参考に、コザック配列の付加とヒトコドンへの最適化を行い、pCAGGS-NPco、pCAGGS-P4C(−)co、pEF1-Lco、pCAGGS-F5Rcoを構築した。T7にはP2001-54387Aを参考に430P、849I、880Y変異を導入し、P2003-61683Aを参考に644Y、667Y変異を導入し、得られたT7m配列を搭載するpCAGGS-T7mcoを構築した。P4C(−)は、P遺伝子座からのCタンパク質の発現を消失させた変異である。

[0075] Pタンパク質への変異の種類と変異株名は以下の通りである。

P2 : 433A, 434A, 437A, 511F (配列番号2)
P2Y : 433A, 434A, 437A, 511Y (配列番号8)
P2m3SY : 433S, 434S, 437S, 511Y (配列番号9)
P2m3TY : 433T, 434T, 437T, 511Y (配列番号10)
P2m3GY : 433G, 434G, 437G, 511Y (配列番号11)
P2m3SF : 433S, 434S, 437S, 511F (配列番号12)
P2m433S : 433S, 434A, 437A, 511F (配列番号13)
P2m433SY : 433S, 434A, 437A, 511Y (配列番号14)
P2m434SY : 433A, 434S, 437A, 511Y (配列番号15)
P2m437SY : 433A, 434A, 437S, 511Y (配列番号16)

[0076] SeVの再構成用プラスミドとトランスフェクション試薬比率はWO2005/071092に従った。具体的には、以下の重量のプラスミドとトラ

ンスフェクション試薬 (TransIT-LT1 Reagent または ViaFect) を混合してプラスミドミックスを得た。

[0077] NP、P4C (−)、F5R、T7 : 各 0.5 μ g

L : 2 μ g

pSeV : 5 μ g

プラスミドの合計 : 9 μ g

TransIT-LT1 Reagent または ViaFect : 15 μ L

[0078] 以下、断りのない限り、トランスフェクション試薬の容積とプラスミドの重量は、9 : 15 となるように混合した。

[0079] 225 μ L の OptiMEM にプラスミドとトランスフェクション試薬を混和し、500 μ L の培地 (10% FBS / E-MEM) で培養中の 12 ウェルプレートの F 遺伝子発現細胞にトランスフェクションし、37℃ で培養した。トランスフェクション翌日から 32℃ で培養した。培地交換は、2.5 μ g / mL トリプシンを添加した無血清培地 (ITS-X / NEAA / E-MEM) で毎日行った。トランスフェクション 3 日目の培養上清を回収し、培養フラスコに播種した F 遺伝子発現細胞に感染させ、SeV の増幅を行った。フラスコから 3 ~ 5 日目の培養上清を回収し、10 倍 ~ 10 万倍希釈を行い、96 ウェルプレートに播種した Vero 細胞に感染させ、感染 3 日後の GFP 陽性細胞数を蛍光顕微鏡システム ECLIPSE Ti2-E (ニコン) を用いて計測し、感染力価を算出した。

[0080] 得られた SeV 変異体を Vero 細胞に感染させた (MOI = 20)。感染細胞を 35℃ または 38.5℃ の温度条件下で 3 日間培養した。SeV ベクターは細胞内に EmGFP を発現し、感染細胞は、細胞内 SeV 量に応じた蛍光を発するので、感染細胞中の SeV 量を細胞からの蛍光を測定することにより推定した。結果は、図 1A および 1B に示される通りであった。図 1A に示されるように、P2m3SY 変異体は、35℃ では強い蛍光を示したが、38.5℃ ではその蛍光は強く低下した。図 1B には、蛍光量の数値

が示されているが、P2m3SY変異体は、38.5℃では、35℃と比較して約0.013%まで蛍光量が低下した。P2変異体では、38.5℃では、35℃と比較して約5.7%まで蛍光量が低下した。このことから、P2m3SY変異体は、P2変異体と比較して400倍以上も温度感受性が高いことが示された。

[0081] (4) 更なる温度感受性変異の導入

次に、得られたSeV変異体をVerο細胞に感染させた(MOI=20)。感染細胞を35℃または38.5℃の温度条件下で3日間培養し、上記と同様にして感染細胞中のSeV量を細胞からの蛍光を測定することにより推定した。P2の35℃条件下での培養物からの蛍光量を1とし、相対値により各蛍光量を求めた。結果は、図2および表1に示される通りであった。図2に示されるように、各変異体は、37℃では温度感受性でも少しの温度感受性を示したが、38.5℃の温度条件下で培養すると、蛍光量が大幅に低下した。表1で蛍光相対量を比較すると、いずれの変異体もP2よりも温度感受性が向上していることが明らかとなった。変異体の中では、P2m433Sが最も大きく温度感受性を高めた。

[0082] [表1]

表1：各種変異体の各温度における相対蛍光強度

	35℃	37℃	38.5℃
P2	100.0%	96.5%	5.65%
P2m433S	81.8%	76.2%	0.255%
P2m433SY	94.3%	89.1%	2.35%
P2m434SY	94.2%	88.5%	1.08%
P2m437SY	109.8%	107.9%	4.65%
P2m3SY	90.4%	72.8%	0.0129%

[0083] 得られたSeV変異体をVerο細胞に感染させた(MOI=10)。その後、32℃、35℃、37℃、または38.5℃の温度条件下で培養した。SeVベクターは細胞内にEmGFPを発現し、感染細胞は、細胞内SeV量に応じた蛍光を発する。各変異体を各温度条件下で培養して、3日後に

細胞からの蛍光量を測定した。結果は、図3および表2に示される通りであった。P2Yを100%としたときの相対的な蛍光強度により表示した。図3に示されるように、各変異体は、37℃においても温度感受性を示したが、38.5℃の温度条件下で培養すると、蛍光量が顕著に低下した。表2で蛍光相対量を比較すると、いずれの変異体もP2よりも温度感受性が向上していることが明らかとなった。

[0084] [表2]

表2：各種変異体の各温度における相対蛍光強度

	32℃	35℃	37℃	38.5℃
P2Y	118.9%	100.0%	74.6%	0.186%
P2m3SY	109.2%	84.8%	31.9%	0.00047%
P2m3TY	87.6%	59.3%	9.5%	ND
P2m3GY	56.6%	32.9%	5.6%	0.00046%
P2m3SF	75.1%	56.4%	26.7%	0.00144%

[0085] 上記変異体に対して、ウイルスゲノム上で、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するLタンパク質への変異をさらに追加した。変異は、Lタンパク質のN1197とL1361とL1558とK1796に導入した。具体的な変異は、以下の通りである。

LmCI : N1197S, L1361C, L1558I, K1796E (配列番号17)

[0086] パッケージング細胞から得られたSeVをVer o細胞に感染させた(MOI=20)。その後、35℃、37℃、または38.5℃の温度条件下で培養した。SeVベクターは細胞内にEmGFPを発現し、感染細胞は、細胞内SeV量に応じた蛍光を発する。各変異体を各温度条件下で培養して、3日後に細胞からの蛍光量を測定した。結果は、図4および表3に示される通りであった。P2+LmCIを100%としたときの相対的な蛍光強度により表示した。その結果、P2m3SY+LmCI、P2m3TY+LmCI、およびP2m3GY+LmCIはいずれも、蛍光量が、37℃での培養後は減少し、38.5℃での培養後は蛍光が検出されなかった。P2m3TY+LmCI、およびP2m3GY+LmCIでは、35℃および37℃の

温度条件下の培養でも強い温度感受性を示した。なお、Lタンパク質として配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する変異体を用いた場合にも、温度感受性を示したが、上記配列番号17に記載のアミノ酸配列を有する変異体の方が温度感受性は高かった。このことから、L1361への変異とL1558への変異のいずれか一方または両方を導入することで、Lタンパク質は、SeVに対して温度感受性を付与しうる。

[0087] [表3]

表3：各種変異体の各温度における相対蛍光強度

	32°C	35°C	37°C	38.5°C
P2	151.8%	100.0%	54.6%	ND
P2m3SY	150.0%	104.3%	0.38%	ND
P2m3TY	122.0%	12.0%	ND	ND
P2m3GY	147.6%	32.5%	0.024%	ND

[0088] 同様にしてLmC1を有する各種変異体をパッケージング細胞から得て、Vero細胞に35°Cで感染させた(MOI=20)。35°Cの温度条件下で3日間培養し、継代して、その後は35°C、37°C、または、38.5°Cの温度条件下でさらに7または14日間培養した。細胞からの蛍光強度を測定した。結果は、図5および表4に示される通りであった。図5Aおよび表4に示されるように、P2m3SY+LmC1は、37°Cの温度条件下でもある程度の温度感受性を示したが、38.5°Cの温度条件下では強い温度感受性を示した。

[0089] [表4]

表4：各種変異体の各温度における相対蛍光強度

		day3+0	day3+7	day3+14
35°C	P2	100%	112.57%	103.62%
	P2m3SY	88%	76.72%	73.34%
37°C	P2	100%	68.70%	68.98%
	P2m3SY	88%	7.04%	1.47%
38.5°C	P2	100%	0.0078%	ND
	P2m3SY	88%	0.0018%	ND

[0090] また、L m 1 5 5 8 I を有する各種変異体をパッケージング細胞から得て、V e r o 細胞に 3 5 °C で感染させた (M O I = 2 0) 。 3 5 °C の温度条件下で 3 日間培養し、継代して、その後は 3 5 °C、3 7 °C、または、3 8 . 5 °C の温度条件下でさらに 7 または 1 4 日間培養した。細胞からの蛍光強度を測定した。結果は、図 5 B および表 4 - 1 に示される通りであった。図 5 B および表 4 - 1 に示されるように、P 2 m 3 S Y + L m 1 5 5 8 I は、3 7 °C の温度条件下でもある程度の温度感受性を示したが、3 8 . 5 °C の温度条件下では強い温度感受性を示した。

[0091] [表4-1]

		day3+0	day3+7	day3+14
35 °C	P2	100%	169%	144%
	P2m3SY	235%	201%	164%
37 °C	P2	100%	108%	91.3%
	P2m3SY	235%	57.5%	38.7%
38.5 °C	P2	100%	0.042%	0.0028%
	P2m3SY	235%	0.013%	ND

[0092] (5) S e V による目的遺伝子の細胞への導入

ヒト線維芽細胞に増殖因子を搭載した S e V を感染させ、細胞数を計測した。S e V としては、P 2 m 3 S Y を用い、ゲノムに増殖因子としてサイクリン D 1 と C D K 4 (R 2 4 C) を搭載した。試験ベクターとして増殖因子搭載 S e V ベクターと、陰性対照として E m G F P を搭載した S e V ベクターをヒト線維芽細胞に感染させ (M O I = 2 0) 、7 日毎に継代し、細胞数を計数した。結果は、図 6 に示される通りであった。増殖因子搭載 S e V ベクターでは、細胞数が当初の 1 5 6 倍にまで増加した。これに対して陰性対照では、細胞数は当初の 9 倍に留まった。このことから、本発明の温度感受性ベクターは、外来遺伝子を感染細胞に導入し、感染細胞で発現させることに適している。また、培養後、温度を高温にすることにより、S e V ベクターを細胞内から除去することができ、細胞内ベクター量は検出限界以下になる。これにより、遺伝子導入後には、除去可能な S e V ベクターシステムを

構築できたことが明らかになった。

[0093] さらに本実施例では、ヒト臍帯マトリックス由来間葉系幹細胞（MSC）およびヒト新生児包皮由来線維芽細胞（NHDF細胞）に対して、CyclinD1、CDK4（R24C）、およびTERTの組合せ（上記組合せを以下「CCT」という）を、上記温度感受性ベクター（SeV／TSdF－P2m434SY）により導入して、細胞増殖への影響を確認した。センダイウイルスゲノムは、PM位にCCTを搭載し、MHN位にmEmeraldを搭載した。コラーゲンプレート上で10％FBS含有DMEM／F12培地で培養した。7日に1回継代し、継代の度に細胞数を計測した。継代の際には、一定の細胞数を採取して、一定量の新鮮な培地中に播種した。42日後の細胞数を計測し、増殖率を計算した。結果は表5に示される通りであった。表5に示されるように、対照（Control）のMSCが137倍に増殖したのに対して、CCTを本発明のSeVを用いて導入したMSCは1,320万倍にまで増殖した。また、42日間で対照のNHDFが12.1倍に増殖したのに対して、CCTを本発明のSeVを用いて導入したNHDFは147万倍にまで増殖した。

[0094] [表5]

表5：CCT導入のMSCおよびNHDFの増殖への影響

MSCの細胞増殖（35℃）			NHDFの細胞増殖（35℃）		
	day0	day42		day0	day42
Control	1.00.E+05	1.37.E+07	Control	1.00E+05	1.21.E+06
CCT	1.00.E+05	1.32.E+12	CCT	1.00E+05	1.47.E+11

[0095] さらに本実施例では、ヒト線維芽細胞に対して、リプログラミング因子を搭載したセンダイウイルスベクターを感染させて（MOI＝20）、抗NANOG抗体を用いた免疫細胞化学染色により感染後の細胞を観察した。リプログラミング因子としては、KLF4、OCT4、SOX2、とMYCLを用いた。ベクターは、P2m3SYとLmCI変異を有するベクターとし、KLF4、OCT4、SOX2を同時搭載したもの（KOS）とMYCLを搭載したものとを用意した。ヒト線維芽細胞に2種のベクターを感染させ、

5日後に継代し、6日後にS t e m F i t 培地に培地を交換した。11日後に細胞におけるN A N O Gの発現を抗N A N O G抗体を用いて観察した。すると図7 Aに示されるように、センダイウイルスベクターで処理したヒト線維芽細胞は、リプログラミングし、N A N O Gの発現を誘導した。細胞のリプログラミング後に、培地の温度を38.5℃に上昇させると細胞内からセンダイウイルスベクターが除去され、細胞内ベクター量は検出限界以下になる。しかし、リプログラミング因子を導入した線維芽細胞をi M a t r i x - 5 1 1でコートしたプレート上でS t e m F i t A K 9 2 N培地中で培養したところ、37℃の温度条件下でもS e Vベクターは細胞から徐々に除去され、28日目にはS e Vから発現するE m G F Pの蛍光が検出限界以下となった(図7 B参照)。

[0096] (6) デグロンによる更なるS e Vの除去の促進

Pタンパク質に対してタンパク質分解タグ(デグロン)を付加することによって、S e Vの除去を促進することができる。DDタグは、タンパク質分解タグの一種である(例えば、US 2 0 0 9 / 0 2 1 5 1 6 9 A参照)。DDタグ(配列番号18参照)は、FKBP12にF36VとL106Pが導入されて得られる107アミノ酸長のタンパク質である。低分子化合物であるS h i e l d 1を添加すると安定化し、dTAG-13を添加することにより、タグに融合しているタンパク質も一緒に分解が促進される。本実施例では、DDタグに対して11の変異(4I、18K、36L、50I、57K、59F、63A、68L、90V、98I、および105R)を有するDD変異体(DDm; 配列番号19参照)を作製した。本実施例では、DDmによるタンパク質分解促進作用を検討するため、E m G F PのC末端にDDタグおよびその変異体(DDmを含む)を付加してS e Vベクター(上記WO 2 0 0 3 / 0 2 5 5 7 0の変異を有する)の+位に搭載した。得られたS e VをH e L a細胞に感染させ(MOI=10)、感染翌日に、1μMのS h i e l d 1または5μMのdTAG-13を添加して、感染3日後に細胞からの蛍光を観察した。結果は表6および表7に示される通りであった。

なお、配列番号 28 に記載のアミノ酸配列を有する DDrs タグを作製して EmGFP の C 末端に付加したところ、Shield1 による EmGFP の安定化効果は得られず、DD タグ化 EmGFP の蛍光強度の約 20% の蛍光強度しか示さなかった (図 8)。

[0097] [表6]

表 6 : DDm タグによる分解促進の効果

Degron を付加した EmGFP の相対蛍光強 (37°C)

37°C	Shield1	dTAG-13	(-)	Shield1/(-)	Shield1/ dTAG-13
DD	100.0%	0.545%	25.2%	3.97	183.3
DD36l	109.5%	0.602%	26.6%	4.11	181.9
DD36L	129.8%	1.098%	29.8%	4.35	118.2
DD36L90V	144.4%	1.301%	50.4%	2.87	111.0
DDm	140.4%	0.478%	15.0%	9.39	293.9

[0098] [表7]

表 7 : DDm タグによる分解促進の効果

Degron を付加した EmGFP の相対蛍光強 (38.5°C)

38.5°C	Shield1	dTAG-13	(-)	Shield1/(-)	Shield1/ dTAG-13
DD	100%	0.10%	7.3%	13.79	973.3
DD36l	137%	0.10%	8.0%	17.21	1328.0
DD36L	167%	0.16%	12.5%	13.36	1025.4
DD36L90V	191%	0.18%	22.5%	8.48	1085.2
DDm	153%	0.05%	2.5%	61.47	3181.7

[0099] 表 6 および表 7 に示されるように、DDm は、Shield1 に対する安定性が向上し、dTAG-13 による分解促進効果を向上させた。その結果、Shield1/dTag-13 比が顕著に向上した。

[0100] 次に、P タンパク質の各種温度感受性変異体の C 末端に DDm タグを付加した。SeV ゲノムの + 位に EmGFP を搭載した。HeLa 細胞に、DDm タグを付加した各種温度感受性変異体を発現する SeV を感染させ (MOI = 10)、3 日後に EmGFP 由来の蛍光強度を確認した。結果は図 9 および表 8 に示される通りであった。

[0101]

[表8]

表8：DDm非導入または導入Pタンパク質を有するSeVの細胞からの除去

	32°C	35°C	37°C	37.5°C	38.5°C
P2Y	100.0%	131.2%	122.5%	87.0%	19.1%
P2m3SY	121.6%	128.4%	83.4%	27.6%	0.00036%
P2m3TY	109.9%	100.1%	2.1%	0.018%	N.D.
P2m2S434TY	110.8%	107.2%	40.2%	0.132%	N.D.
P2m3TYddm	121.7%	92.4%	0.5%	N.D.	N.D.
P2m2S434TYddm	118.9%	111.4%	15.8%	N.D.	N.D.

※ N. D. は検出限界以下であったことを示す。

[0102] 図9Aおよび表8に示されるように、DDmを付加したP2m3TYddmとP2m2S434TYddmは、SeVの除去効率を向上させ、37.5°Cの温度条件下でも細胞からのSeVの除去を促進した。この結果は、dTAG-13非存在下での結果であり、DDmタグの付加は、Pタンパク質をdTAG-13非存在下でも不安定化させることが示唆された。図9Bおよび表9に示されるように、dTAG-13存在下ではDDmタグを付加したPタンパク質の不安定化はさらに促進された。

[0103] [表9]

表9：DDrsタグによるタンパク質安定化効果

		day3+0	day3+7	day3+14
37.5°C	P2m3SY	100.0%	61.5%	30.8%
	P2m3SYddm	47.9%	0.787%	0.13%
	P2m3SYddm+dTAG-13	42.3%	0.027%	N.D.

[0104] (7) SeVの細胞毒性の低減

SeVは細胞傷害性を誘発する。この細胞傷害性を低減する目的でMタンパク質、およびHNタンパク質にアミノ酸変異を導入することができ、上述のように、本実施例のSeVは基本的にそのような変異を既に導入している(WO2003/025570)。本実施例では、Mタンパク質およびHNタンパク質のそれぞれのアミノ酸変異をさらに検討した。具体的には、Mタ

ンパク質には、G 6 9 E、およびT 1 1 6 Aに加えてA 1 8 3 Tを導入した（配列番号20参照）。また、HNタンパク質には、A 2 6 2 T、およびK 4 6 1 Eに加えてG 2 6 4 Kを導入した（配列番号21参照）。Pタンパク質にはL 5 1 1 Y、Lタンパク質には、N 1 1 9 7 S、およびK 1 7 9 6 Eを導入した。その上で、+位にEmGFPを有するSeVを構築して、Ver o細胞に感染させ、32℃で20日間感染細胞を培養した。Ver o細胞におけるEmGFP由来の蛍光強度を測定した。

[0105] 結果は図10に示される通りであった。図10に示されるように、A 1 8 3 Tを有するMタンパク質は、蛍光強度を対照の2.6倍に増加させ、G 2 6 4 Kを有するHNタンパク質は、蛍光強度を3.9倍に増加させた。対照で観察されるEmGFP陽性細胞のディッシュからの剥離が、上記変異体を有するSeV感染細胞では、当該剥離が軽減した。したがって、上記変異は、SeVによる細胞毒性を低減することが示唆された。なお、上記Mタンパク質の変異体を有するSeVベクターに初期化因子を搭載して線維芽細胞に感染させたところ、線維芽細胞のリプログラミングを誘導させることができた。

[0106] (8) パッケージング細胞の作製

Ver o細胞およびLLC-MK2細胞からマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのパッケージング細胞を樹立した。具体的には、ベクターにFをコードする遺伝子と、PKR阻害因子をコードする遺伝子とを搭載し、パッケージング細胞に導入して、Fをコードする遺伝子とPKR阻害因子をコードする遺伝子を発現するパッケージング細胞を安定株として得た。PKR阻害因子としてはVAIを用いた。VAIの挿入位置は特に限定されないが、本実施例では、Fをコードする遺伝子の下流にVAIをコードする配列を導入した（図11A参照）。これらの搭載遺伝子は、任意のプロモーターにより駆動させることができるが、本実施例では、CAGプロモーターにより駆動させた（図11A参照）。但し、CAGプロモーターとFをコードする遺伝子の間には、2つの部位特異的組換え配列（ここではI o x P

）で挟まれた領域を介在させ、C r eリコンビナーゼ等によりI o x Pで挟まれた領域を除去することで、Fをコードする遺伝子がC A Gプロモーターにより強力に駆動されるようにベクターを構築した。I o x Pの間には、i C a s p a s e 9とN e o R（ネオマイシン耐性遺伝子）を2 A配列で連結してなる融合タンパク質をコードする遺伝子を搭載した。これにより、一定濃度のG 4 1 8などの薬剤存在下で、生存できる程度にN e o Rの発現量の高いクローン（導入コピー数の多いクローンを含む）を選択することを可能とした。このような設計思想に基づいてp C A L N d Lベクター（JOURNAL OF VIROLOGY, Feb. 1998, p. 1115-1121）からp C A L i N d L v - Fベクターを構築した（図1 1 A）。S e V - C r eは、+位にC r eリコンビナーゼをコードする遺伝子を搭載し、M H N位に蛍光タンパク質であるm E m e r a l dを搭載した。これによりウイルスの増殖をm E m e r a l dの傾向により確認できる。S e V - C r eは、温度依存的に細胞から除去される温度感受性を示すゲノムを有するものとすることもできる。

[0107] L L C - M K 2細胞およびV e r o細胞にp C A L i N d L v - Fベクターを導入後、3 7℃でG 4 1 8による薬剤選択を実施した。得られたクローンにS e V - C r eを導入し、3 2℃で細胞を培養した。その結果、図1 1 B（1 s t）に示されるように、L L C - M K 2細胞にもV e r o細胞にも良好に感染した。1 s t細胞からの上清を2 n d細胞と接触させた。前記上清に感染能を有するウイルスが含まれていれば、2 n d細胞に感染し、m E m e r a l d由来の蛍光を生じるはずである。2 n d細胞への感染実験の結果、L L C - M K 2細胞にも、V e r o細胞にも上清は感染し、細胞にm E m e r a l d由来の蛍光を生じさせた（図1 1 Bの2 n d参照）。上清に感染能を有するウイルスが含まれない場合には、L L C - M K 2細胞では2 n dの下段パネル、V e r o細胞では2 n dの中段パネルに示されるように2 n d細胞にウイルスが感染せず、細胞にm E m e r a l d由来の蛍光を生じさせることができない。本実施例では、L L C - M K 2細胞でもV e r o細胞でも再現性をもって感染能を有するウイルスを産生させることができている。

るため、当業者であれば、適宜感染能を有するウイルスを産生させることができることを理解できる。上記結果は、より詳細には、LLC-MK2細胞およびVero細胞内でG418による薬剤選択によってFおよびPKR阻害因子の高発現クローンを選択できたこと（LLC-MK2細胞に対しては1.3～2.5 mg/mLのG418を用い、Vero細胞に対しては0.9～1.5 mg/mLのG418を用いた）、および、SeVが搭載するCreリコンビナーゼの働きにより、loxP間の配列が除去されてFが高発現したことを示唆する。結果、1st細胞でSeVの産生が認められ、2nd細胞にも感染したことで、感染能を有するウイルスが1st細胞で産生できたことが明らかである。このように上記プラスミドは、1st細胞（通常のLLC-MK2細胞およびVero細胞）からパッケージング細胞を作製する有用なツールとなることが示唆された。今回の系では、1st細胞中には、SeV-Creが残存していると考えられる。したがって、1st細胞中のSeV-Creをその後に除去することにより、得られた細胞は、SeV再構成用のパッケージング細胞として活用することができる。SeV-Creの除去は、細胞の単なる継代によっても行い得るが、除去効率を高めるために、温度感受性株の利用およびマイクロRNAの活用など、様々な方法が知られており、適宜、除去することができるであろう。その後、37℃の温度条件下でさらに細胞をリクローニングすると、細胞からSeVが除去されたF発現細胞が得られた。Fの発現によりLLC-MK2細胞およびVero細胞は、パッケージング細胞として用いることができたが、Fは、細胞側から供給してもよいし、プラスミドにより供給してもよいし、センダイウイルスゲノムから供給されてもよいことが理解できる。

[0108] 配列表：

配列番号1：センダイウイルスの野生型Pタンパク質のアミノ酸配列の一例
MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGD SGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180

TSLPDEGEGG ASNNGRSM EP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITDRGGKTDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD L 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL LPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 2 : センダイウイルスの P タンパク質変異体 (P 2) のアミノ酸配列

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGD SGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSM EP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITAAGGATDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD L 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL FPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 3 : センダイウイルスの P タンパク質変異体 (L 5 1 1 F) のアミノ酸配列

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGD SGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSM EP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420

LMSNLSTLHI ITDRGGKTDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL FPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号4：センダイウイルスの温度感受性Pタンパク質変異体のアミノ酸配列

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGD SGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSMEP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITXXGGXTDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL XPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号5：センダイウイルスの野生型Lタンパク質のアミノ酸配列の一例

MDGQESSQNP SDILYPECHL NSPIVRGKIA QLVLLDVNQ PYRLKDDSII NITKHKIRNG 60
GLSPRQIKIR SLGKALQRTI KDLDRYTFEP YPTYSQELLR LDIPEICDKI RSVFAVSDRL 120
TRELSSGFQD LWLNIFKQLG NIEGREGYDP LQDIGTIPEI TDKYSRNRWY RPFLTWFSEK 180
YDMRWMQKTR PGGPLDTSNS HNLLECKSYT LVTYGDVMI LNKLTLTGYI LTPELVLMYC 240
DVVEGRWNMS AAGHLDKCSI GITSKGEELW ELVDSL FSSL GEEIYNVIAL LEPLSLALI 300
LNDPVIPLRG AFMRHVTEL QTVLTSRDVY TDAEADTIVE SLLAIFHGTS IDEKAEIFS 360
FRTEGHPSLE AVTAADKVRA HMYAQKAIKL KTLYECHAVF CTIINGYRE RHGGQWPPCD 420
FPDHVCLELR NAQGSNTAIS YECAVDNYTS FIGFKFRKFI EPQLDEDLTI YMKDKALSPR 480
KEAWDSVYPD SNLYYKAPES EETRRLIEVF INDENFNPEE IINYVESGDW LKDEEFNISY 540
SLKEKEIKQE GRLFAKMTYK MRAVQVLAET LLA KGIGELF SENG MVKGEI DLLKRLTTLS 600
VSGVPRTDSV YNNSKSSEKR NEGMENKNSG GYWDEKKRSR HEFKATDSST DGYETLSCFL 660
TTDLKKYCLN WRFESTALFG QRCNEIFGFK TFFNWMHPVL ERCTIYVGDP YCPVADRMHR 720

QLQDHADSGI FIHNPRGGIE GYCQKLWTLI SISAIHAAV RVGVRVSAMV QGDNQAI AVT 780
SRVPVAQTYK QKKNHVYEEI TKYFGALRHV MFDVGHELKL NETIISKMF VYSKRIYYDG 840
KILPQCLKAL TKCVFWSETL VDENSACSN ISTSIKAIE NGYSPILGYC IALYKTCQQV 900
CISLGMTINP TISPTVRDQY FKGKNWLRCA VLIPANVGGF NYMSTSRCFV RNIGDPAVAA 960
LADLKRFIRA DLLDKQVLYR VMNQEPGDSS FLDWASDPYS CNLPHSQSIT TIIKNITARS 102
0
VLQESPNPLL SGLFTETSGE EDNLASFLM DRKVILPRVA HEILGNSLTG VREAIAGMLD 108
0
TTKSLVRASV RKGGLSYGIL RRLVNYDLLQ YETLTRTLRK PVKDNIEYEV MCSVELAVGL 114
0
RQKMWIHLTY GRPIHGLET PLELLRGIF IEGSEVCKLC RSEGADPIYT WFYLPDNIDL 120
0
DTLTNGCPAI RPYFGSATD ERSEAQLGYV RNLSKPAKAA IRIAMVYTWA YGTDEISWME 126
0
AALIAQTRAN LLENLKLIT PVSTSTNLSH RLKDTATQMK FSSATLVRAS RFITISNDNM 132
0
ALKEAGESKD TNLVYQQIML TGLSLFEFNM RYKKGSLGKP LILHLHLNNG CCIMESPQEA 138
0
NIPPRSTLDL EITQENNKLI YDPDPLKDVD LEFSKVRDV VHTVDMTYWS DDEVIRATSI 144
0
CTAMTIADTM SQLDRDNLKE MIALVNDDDV NSLITEFMVI DVPLFCSTFG GILVNQFAYS 150
0
LYGLNIRGRE EIWGHVVRIL KDTSHAVLKV LSNALSHPKI FKRFWNAGVV EPVYGPNLSN 156
0
QDKILLALSV CEYSVDLFMH DWQGGVPLEI FICDNDPDVA DMRRSSFLAR HLAYLCSLAE 162
0
ISRDPRLS MNSLERLESL KSYLELTFLD DPVLRYSQLT GLVIKVPST LTYIRKSSIK 168
0

VLTRGIGVP EVLEDWDPEA DNALLDGIAA EIQQNIPLGH QTRAPFWGLR VSKSQVLRLR 174

0

GYKEITRGEI GRSGVGLTLP FDGRYLSHQL RLFGINSTSC LKALELTYLL SPLVDKDKDR 180

0

LYLGEGAGAM LSCYDATLGP CINYNSGVY SCDVNGQREL NIYPAEVALV GKKLNNVTSL 186

0

GQRVKVLFNG NPGSTWIGND ECEALIWNEL QNSSIGLVHC DMEGGDHKDD QVVLHEHYSV 192

0

IRIAYLVGDR DVVLISKIAP RLGTDWTRQL SLYLRYWDEV NLIVLKTSNP ASTEMYLLSR 198

0

HPKSDIIEDS KTVLASLLPL SKEDSIKIEK WILIEKAKAH EWVTRELREG SSSSGMLRPY 204

0

HQALQTFGE PNLKLSRDF LSTMNIADTH NCMIAFNRLV KDTIFEWARI TESDKRLKLT 210

0

GKYDLYPVRD SGKLKTISRR LVLSWISLSM STRLVTSFSP DQKFEARLQL GIVSLSSREI 216

0

RNLRVITKTL LDRFEDIIHS ITYRFLTKEI KILMKILGAV KMFGARQNEY TTVIDDGSLG 222

0

DIEPYDSS 222

8

配列番号6：センダイウイルスの温度感受性Lタンパク質変異体のアミノ酸配列

MDGQESSQNP SDILYPECHL NSPIVRGKIA QLHVLLDVNQ PYRLKDDSII NITKHKIRNG 60

GLSPRQIKIR SLGKALQRTI KDLDRYTFEP YPTYSQELLR LDIPEICDKI RSVFAVSDRL 120

TRELSSGFQD LWLNIFKQLG NIEGREGYDP LQDIGTIPEI TDKYSRNRWY RPFLTWFSIK 180

YDMRWMQKTR PGGPLDTSNS HNLLECKSYT LVTYGDVMI LNKLTLTGYI LTPELVLMYC 240

DVVEGRWNMS AAGHLDKCSI GITSKGEELW ELVDSLFSLL GEEIYNVIAL LEPLSLALIQ 300

LNDPVIPLRG AFMRHVLTTEL QTVLTSRDVY TDAEADTIVE SLLAIFHGTS IDEKAEIFS 360

FRTFGHPSLE AVTAADKVRA HMYAQKAIKL KTLYECHAVF CTIINGYRE RHGGQWPPCD 420
FPDHVCLELR NAQGSNTAIS YECAVDNYTS FIGFKFRKFI EPQLDEDLTI YMKDKALSPR 480
KEAWDSVYPD SNLYYKAPES EETRRLIEVF INDENFNPEE IINYVESGDW LKDEEFNISY 540
SLKEKEIKQE GRLFAKMTYK MRAVQVLAET LLAKEGIGELF SENGVMVKGEI DLLKRLTTLS 600
VSGVPRTDSV YNNSKSSEKR NEGMENKNSG GYWDEKKRSR HEFKATDSST DGYETLSCFL 660
TTDLKKYCLN WRFESTALFG QRCNEIFGFK TFFNWMHPVL ERCTIYVGGP YCPVADRMHR 720
QLQDHADSGI FIHNPRGGIE GYCQKLWTLI SISAIHLAAV RVGVRVSAMV QGDNQAIIVT 780
SRVPVAQTYK QKKNHVYEEI TKYFGALRHV MFDVGHELKL NETIISSEMF VYSKRIYYDG 840
KILPQCLKAL TKCVFWSETL VDENRSACSN ISTSIKAIE NGYSPILGYC IALYKTCQQV 900
CISLGMTINP TISPTVRDQY FKGKNWLRCA VLIPANVGGF NYMSTSRFCV RNIGDPAVAA 960
LADLKRFIRA DLLDKQVLYR VMNQEPGDSS FLDWASDPYS CNLPHSQSIT TIIKNITARS 102
0
VLQESPNPLL SGLFTETSGE EDNLASFLM DRKVILPRVA HEILGNSLTG VREAIAGMLD 108
0
TTKSLVRASV RKGGLSYGIL RRLVNYDLLQ YETLTRTLRK PVKDNIEYEW MCSVELAVGL 114
0
RQKMWIHLTY GRPIHGLETG DPLELLRGIF IEGSEVCKLC RSEGADPIYT WFYLPDXIDL 120
0
DTLTNGCPAI RPYFGSATD ERSEAQLGYV RNLSKPAKAA IRIAMVYTWA YGTDEISWME 126
0
AALIAQTRAN LLENLKLIT PVSTSTNLSH RLKDTATQMK FSSATLVRAS RFITISNDNM 132
0
ALKEAGESKD TNLVYQQIML TGLSLFEFNM RYKKGSLGKP XILHLHLNNG CCIMESPQEA 138
0
NIPPRSTLDL EITQENNKLI YDPDPLKDVD LELFSKVRDV VHTVDMTYWS DDEVIRATSI 144
0
CTAMTIADTM SQLDRDNLKE MIALVNDDDV NSLITEFMVI DVPLFCSTFG GILVNQFAYS 150
0

LYGLNIRGRE EIWGHVVRIL KDTSHAVLKV LSNALSHPKI FKRFWNAGVV EPVYGPNXSN 156

0

QDKILLALSV CEYSVDLFMH DWQGGVPLEI FICDNDPDVA DMRRSSFLAR HLAYLCSLAE 162

0

ISRDGPRLES MNSLERLESL KSYLELTFLD DPVLRYSQLT GLVIKVPST LTYIRKSSIK 168

0

VLTRGIGVP EVLEDWDPEA DNALLDGIAA EIQQNIPLGH QTRAPFWGLR VSKSQVLRLR 174

0

GYKEITRGEI GRSGVGLTLP FDGRYLSHQL RLFGINSTSC LKALELTYLL SPLVDXDKDR 180

0

LYLGEGAGAM LSCYDATLGP CINYNSGVY SCDVNGQREL NIYPAEVALV GKKLNNVTSL 186

0

GQRVKVLFNG NPGSTWIGND ECEALIWNEL QNSSIGLVHC DMEGGDHKDD QVVLHEHYSV 192

0

IRIAYLVGDR DVVLISKIAP RLGTDWTRQL SLYLRYWDEV NLIVLKTSNP ASTEMYLLSR 198

0

HPKSDIIEDS KTVLASLLPL SKEDSIKIEK WILIEKAKAH EWTRELREG SSSSGMLRPY 204

0

HQALQTFGE PNLKLSRDF LSTMNIADTH NCMIAFNRLV KDTIFEWARI TESDKRLKLT 210

0

GKYDLYPVRD SGKLKTISRR LVLSWISLSM STRLVTGSFP DQKFEARLQL GIVSLSSREI 216

0

RNLRVITKTL LDRFEDIIHS ITYRFLTKEI KILMKILGAV KMFGARQNEY TTVIDDGSLG 222

0

DIEPYDSS 222

8

配列番号7：センダイウイルスのLタンパク質の変異体（N1197S／L1558I／K1796E）のアミノ酸配列

MDGQESSQNP SDILYPECHL NSPIVRGKIA QLHVLLDVNQ PYRLKDDSII NITKHKIRNG 60
GLSPRQIKIR SLGKALQRTI KDLDRYTFEP YPTYSQELLR LDIPEICDKI RSVFAVSDRL 120
TRELSSGFQD LWLNIFQLG NIEGREGYDP LQDIGTIPEI TDKYSRNRWY RPFLTWFSSIK 180
YDMRWMQKTR PGGPLDTSNS HNLLECKSYT LVTYGDVMI LNKLTLTGYI LPELVLMYC 240
DVVEGRWNMS AAGHLDKCSI GITSKGEELW ELVDSL FSSL GEEIYNVIAL LEPLSLALIQ 300
LNDPVIPLRG AFMRHVTEL QTVLTSRDVY TDAEADTIVE SLLAIFHGTS IDEKAEIFS 360
FRTFGHPSLE AVTAADKVRA HMYAQKAIKL KTLYECHAVF CTIINGYRE RHGGQWPPCD 420
FPDHVCLELR NAQGSNTAIS YECAVDNYTS FIGFKFRKFI EPQLDEDLTI YMKDKALSPR 480
KEAWDSVYPD SNLYYKAPES EETRRLIEVF INDENFNPEE IINYVESGDW LKDEEFNISY 540
SLKEKEIKQE GRLFAKMTYK MRAVQVLAET LLAKGIGELF SENG MVKGEI DLLKRLTTLS 600
VSGVPRTDSV YNNSKSSEKR NEGMENKNSG GYWDEKKRSR HEFKATDSST DGYETLSCFL 660
TTDLKKYCLN WRFESTALFG QRCNEIFGFK TFFNWMHPVL ERCTIYVGDP YCPVADRMHR 720
QLQDHADSGI FIHNPRGGIE GYCQKLWTLI SISAIHLAAV RVGVRVSAMV QGDNQAI AVT 780
SRVPVAQTYK QKKNHVYEEI TKYFGALRHV MFDVGHELKL NETIISKMF VYSKRIYYDG 840
KILPQCLKAL TKCVFWSETL VDENRSACSN ISTSIKAIE NGYSPILGYC IALYKTCQQV 900
CISLGMTINP TISPTVRDQY FKGKNWLRCA VLIPANVGGF NYMSTSRCFV RNIGDPAVAA 960
LADLKR FIRA DLLDKQVLYR VMNQEPGDSS FLDWASDPYS CNLPHSQSIT TIIKNITARS 102
0
VLQESPNPLL SGLFTETSGE EDNLASFLM DRKVILPRVA HEILGNSLTG VREAIAGMLD 108
0
TTKSLVRASV RKGGLSYGIL RRLVNYDLLQ YETLTRTLRK PVKDNIEY EY MCSVELAVGL 114
0
RQKMWIHLTY GRPIHGLETP DPLELLRGIF IEGSEVCKLC RSEGADPIYT WFYLPDSIDL 120
0
DTLTNGCPAI RPYFGSATD ERSEAQLGYV RNLSKPAKAA IRIAMVYTWA YGTDEISWME 126
0
AALIAQTRAN LLENLKL LT PVSTSTNLSH RLKDTATQMK FSSATLVRAS RFITISNDNM 132
0

ALKEAGESKD TNLVYQQIML TGLSLFEFNM RYKKGSLGKP LILHLHLNNG CCIMESPQEA 138

0

NIPPRSTLDL EITQENNKLI YDPDPLKDVD LEFSKVRDV VHTVDMTYWS DDEVIRATSI 144

0

CTAMTIADTM SQLDRDNLKE MIALVNDDDV NSLITEFMVI DVPLFCSTFG GILVNQFAYS 150

0

LYGLNIRGRE EIWGHVVRIL KDTSHAVLKV LSNALSHPKI FKRFWNAGVV EPVYGNISN 156

0

QDKILLALSV CEYSVDLFMH DWQGGVPLEI FICDNDPDVA DMRRSSFLAR HLAYLCSLAE 162

0

ISRDGPRLES MNSLERLESL KSYLELTFLD DPVLRYSQLT GLVIKVPST LTYIRKSSIK 168

0

VLRTGIGVP EVLEDWDPEA DNALLDGIAA EIQQNIPLGH QTRAPFWGLR VSKSQVLRLR 174

0

GYKEITRGEI GRSGVGLTLP FDGRYLSHQL RLFGINSTSC LKALELTYLL SPLVDEKDR 180

0

LYLGEGAGAM LSCYDATLGP CINYNSGVY SCDVNGQREL NIYPAEVALV GKKLNNVTSL 186

0

GQRVKVLFNG NPGSTWIGND ECEALIWNEL QNSSIGLVHC DMEGGDHKDD QVVLHEHYSV 192

0

IRIAYLVGDR DVVLISKIAP RLGTDWTRQL SLYLRYWDEV NLIVLKTSNP ASTEMYLLSR 198

0

HPKSDIIEDS KTVLASLLPL SKEDSIKIEK WILIEKAKAH EWTRELREG SSSSGMLRPY 204

0

HQALQTFGFE PNLYKLSRDF LSTMNIADTH NCMIAFNRLV KDTIFEWARI TESDKRLKLT 210

0

GKYDLYPVRD SGKLKTISRR LVLSWISLSM STRLVTSFSP DQKFEARLQL GIVSLSSREI 216

0

RNLRVITKTL LDRFEDIIHS ITYRFLTKEI KILMKILGAV KMFGARQNEY TTVIDDGSLG 222
0

DIEPYDSS 222
8

配列番号 8 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGDSGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSMEP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITAAGGATDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL YPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 9 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGDSGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSMEP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITSSGGSTDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL YPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 10 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60

GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGD SGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSM EP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITTTGGTTDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD L 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL YPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 1 1 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGD SGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSM EP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITGGGGGTDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD L 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL YPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 1 2 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGD SGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSM EP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420

LMSNLSTLHI ITSSGGSTDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL FPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 13 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGDSGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSM EP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITSAGGATDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL FPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 14 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGDSGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSM EP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITSAGGATDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL YPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 15 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120

TNSVSQDLGD GGDSGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSMEP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITASGGATDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL YPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 16 : センダイウイルスの P タンパク質変異体の例

MDQDAFILKE DSEVEREAPG GRESLSDVIG FLDAVLSSEP TDIGGDRSWL HNTINTPQGP 60
GSAHRAKSEG EGEVSTPSTQ DNRSGEESRV SGRTSKPEAE AHAGNLDKQN IHRAFGGRTG 120
TNSVSQDLGD GGDSGILENP PNERGYPRSG IEDENREMAA HPDKRGEDQA EGLPEEVRGS 180
TSLPDEGEGG ASNNGRSMEP GSSHSARVTG VLVIPSPELE EAVLRRNKRR PTNSGSKPLT 240
PATVPGTRSP PLNRYNSTGS PPGKPPSTQD EHINSGDTPA VRVKDRKPPI GTRSVSDCPA 300
NGRPIHPGLE TDSTKKGIGE NTSSMKEMAT LLTSLGVIQS AQEFESSRDA SYVFARRALK 360
SANYAEMTFN VCGLILSAEK SSARKVDENK QLLKQIQESV ESFRDIYKRF SEYQKEQNSL 420
LMSNLSTLHI ITAAGGSTDN TDSLTRSPSV FAKSKENKTK ATRFDPSMET LEDMKYKPD 480
IREDEFRDEI RNPVYQERDT EPRASNASRL YPSKEKPTMH SLRLVIESSP LSRAEKVAYV 540
KSLSKCKTDQ EVKAVMELVE EDIESLTN 568

配列番号 17 : センダイウイルスの L タンパク質変異体の例

MDGQESSQNP SDILYPECHL NSPIVRGKIA QLVLLDVNQ PYRLKDDSII NITKHKIRNG 60
GLSPRQIKIR SLGKALQRTI KDLDRYTFEP YPTYSQELLR LDIPEICDKI RSVFAVSDRL 120
TRELSSGFQD LWLNIFKQLG NIEGREGYDP LQDIGTIPEI TDKYSRNRWY RPFLTWFSLK 180
YDMRWMQKTR PGGPLDTSNS HNLLECKSYT LVTYGDLVMI LNKLTLTGYI LTPELVLMYC 240
DVVEGRWNMS AAGHLDKCSI GITSKGEELW ELVDSLFSLL GEEIYNVIAL LEPLSLALIQ 300
LNDPVIPLRG AFMRHVLTTEL QTVLTSRDVY TDAEADTIVE SLLAIFHGTS IDEKAEIFS 360
FRTFGHPSLE AVTAADKVRA HMYAQKAIKL KTLYECHAVF CTIINGYRE RHGGQWPPCD 420
FPDHVCLELR NAQGSNTAIS YECAVDNYTS FIGFKFRKFI EPQLDEDLTI YMKDKALSPR 480

KEAWDSVYPD SNLYYKAPES EETRRLIEVF INDENFNPEE IINYVESGDW LKDEEFNISY 540
SLKEKEIKQE GRLFAKMTYK MRAVQVLAET LLAKEGIGELF SENGVMKGEI DLLKRLTTLS 600
VSGVPRTDSV YNNSKSSEKR NEGMENKNSG GYWDEKKRSR HEFKATDSST DGYETLSCFL 660
TTDLKKYCLN WRFESTALFG QRCNEIFGFK TFFNWMHPVL ERCTIYVGDV YCPVADRMHR 720
QLQDHADSGI FIHNPRGGIE GYCQKLWTLI SISAIHAAV RVGVRVSAMV QGDNQAIIVT 780
SRVPVAQTYK QKKNHVYEEI TKYFGALRHV MFDVGHELKL NETIISSEMF VYSKRIIYDG 840
KILPQCLKAL TKCVFWSETL VDENSACSIN ISTSIKAAIE NGYSPILGYC IALYKTCQQV 900
CISLGMTINP TISPTVRDQY FKGKNWLRCA VLIPANVGGF NYMSTSRFCV RNIGDPAVAA 960
LADLKRFIRA DLLDKQVLYR VMNQEPGDSS FLDWASDPYS CNLPHSQSIT TIIKNITARS 102
0
VLQESPNPLL SGLFTETSGE EDNLASFLM DRKVILPRVA HEILGNSLTG VREAIAGMLD 108
0
TTKSLVRASV RKGGLSYGIL RRLVNYDLLQ YETLRTLRK PVKDNIEYEV MCSVELAVGL 114
0
RQKMWIHLTY GRPIHGLETG DPLELLRGIF IEGSEVCKLC RSEGADPIYT WFYLPDSIDL 120
0
DTLTNGCPAI RPYFGSATD ERSEAQLGYV RNLSKPAKAA IRIAMVYTTA YGTDEISWME 126
0
AALIAQTRAN LLENLKLIT PVSTSTNLSH RLKDTATQMK FSSATLVRAS RFITISNDNM 132
0
ALKEAGESKD TNLVYQQIML TGLSLFEFNM RYKKGSLGKP CILHLHLNNG CCIMESPQEA 138
0
NIPPRSTLDL EITQENNKLI YDPDPLKDVD LEFSKVRDV VHTVDMTYWS DDEVIRATSI 144
0
CTAMTIADTM SQLDRDNLKE MIALVNDDDV NSLITEFMVI DVPLFCSTFG GILVNQFAYS 150
0
LYGLNIRGRE EIWGHVVRIL KDTSHAVLKV LSNALSHPKI FKRFWNAGVV EPVYGNISN 156
0

QDKILLALSV CEYSVDLFMH DWQGGVPLEI FICDNDPDVA DMRRSSFLAR HLAYLCSLAE 162

0

ISRDGPRLES MNSLERLESL KSYLELTFLD DPVLRYSQLT GLVIKVPST LTYIRKSSIK 168

0

VLTRGIGVP EVLEDWDPEA DNALLDGIAA EIQQNIPLGH QTRAPFWGLR VSKSQVLRLR 174

0

GYKEITRGEI GRSGVGLTLP FDGRYLSHQL RLFGINSTSC LKALELTYLL SPLVDEKDR 180

0

LYLGEGAGAM LSCYDATLGP CINYNSGVY SCDVNGQREL NIYPAEVALV GKKLNNVTSL 186

0

GQRVKVLFNG NPGSTWIGND ECEALIWNEL QNSSIGLVHC DMEGGDHKDD QVVLHEHYSV 192

0

IRIAYLVGDR DVVLISKIAP RLGTDWTRQL SLYLRYWDEV NLIVLKTSNP ASTEMYLLSR 198

0

HPKSDIIEDS KTVLASLLPL SKEDSIKIEK WILIEKAKAH EWTRELREG SSSSGMLRPY 204

0

HQALQTFGE PNLKLSRDF LSTMNIADTH NCMIAFNRLV KDTIFEWARI TESDKRLKLT 210

0

GKYDLYPVRD SGKLKTISRR LVLSWISLSM STRLVTSFDP DQKFEARLQL GIVSLSSREI 216

0

RNLRVITKTL LDRFEDIIHS ITYRFLTKEI KILMKILGAV KMFGARQNEY TTVIDDGSLG 222

0

DIEPYDSS 222

8

配列番号 18 : D D タグの一例

GVQVETISPG DGRTPKRGQ TCVVHYTGML EDGKKVDSSR DRNPKFKFML GKQEVIRGW

E 60

EGVAQMSVGQ RAKLTISPDY AYGATGHPGI IPPHATLVFD VELLKP

106

配列番号 19 : D D m タグの例

GVQIETISPG DGRTPKKGQ TCVVHYTGML EDGKKLDSSR DRNKPFFKMI GKQEVKGF
E 60

EGAAQMSLGQ RAKLTISPDY AYGATGHPGV IPPHATLIFD VELLRPE

107

配列番号 20 : M タンパク質の変異体

MADIYRFPKF SYEDNGTVEP LPLRTGPDKK AIPHIRIVKV GDPPKHGVRY LDLLLLGFF
E 60

TPKQTTNLES VSDLTEPTSY SICGSGSLPI GVAKYYGTDQ ELLKACTDLR ITVRRAVRA
G 120

EMIVYMVDSI GAPLLPWSGR LRQGMIFNAN KVALAPQCLP VDKDIRLRVY FVNGTSLGA
I 180

TITKIPKTLA DLALPNSISV NLLVTLKTGI STEQKGVLPV LDDQGEKKLN FMVHLGLIR
R 240

KVGKIYSVEY CKSKIERMRL IFSLGLIGGI SFHVQVNGTL SKTFMSQLAW KRAVCFPLM
D 300

VNPHMMNVIW AASVEITGVD AVFQPAIPRD FRYYPNVVAK NIGRIRKL

348

配列番号 21 : H N タンパク質の変異体

MDGDRGKRDS YWSTSPSGST TKPASGWERS SKADTWLLIL SFTQWALSIA TVIICIIIS
A 60

RQGYSMKEYS MTVEALNMSS REVKESLTSL IRQEVIAAV NIQSSVQTGI PVLLNKNSR
D 120

VIQMIDKSCS RQELTQHCES TIAVHHADGI APLEPHSFWR CPVGEPYLSS DPEISLLPG
P 180

SLLSGSTTIS GCVRLPSLSI GEAIYAYSSN LITQGCADIG KSYQVLQLGY ISLNSDMFP
D 240

LNPVVSHTYD INDNRKSCSV VTTKTRGYQL CSMPTVDERT DYSSDGIEDL VLDVLDLKG
R 300
TKSHRYRNSE VLDLHPFSAL YPSVGNGIAT EGSILIFLGYG GLTTPLQGDY KCRTQGCQQ
V 360
SQDTCNEALK ITWLGGKQVV SVIIQVNDYL SERPKIRVTT IPITQNYLGA EGRLLKLGD
R 420
VYIYTRSSGW HSQLQIGVLD VSHPLTINWT PHEALSRPGN EECNWNKCP KECISGVYT
D 480
AYPLSPDAAN VATVTLYANT SRVNPTIMYS NTTNIINMLR IKDVQLEAAY TTTSCITHF
G 540
KGYCFHIIIEI NQKSLNTLQP MLFKTSIPKL CKAES
575

配列番号 22 : ヒト F K B P 1 2 の D D ドメインに対応するウシ F K B P 1
2 のドメインの一例

MGVQVETISP GDGRTPFKRG QTCVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFFV LGKQEVIRGW 60
EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGATGHPG IIPPATLIF DVELLKLE 108

配列番号 23 : ヒト F K B P 1 2 の D D ドメインに対応するアカゲザル F K
B P 1 2 のドメインの一例

MGVEIETISP GDGRTPFKKG QTCVVHYTGM LQNGKKFDSS RDRNKPFFR IGKQEVIRGF 60
EEGAAQMSLG QRAKLTCTPD VAYGATGHPG VIPPNATLIF DVELLNLE 108

配列番号 24 : ヒト F K B P 1 2 の一例

MGVQVETISP GDGRTPFKRG QTCVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFFM LGKQEVIRGW 60
EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGATGHPG IIPPHATLVF DVELLKLE 108

配列番号 25 : ヒト F K B P 1 2 の D D ドメインに対応するマウス F K B P
1 2 のドメインの一例

MGVEIETISP GDGRTPFKKG QICVVHYTGM LQNGKKFDSS RDRNKPFFR IGKQEVIRGF 60
EEGTAQMSLG QRAKLTCTPD VAYGATGHPG VIPPNATLIF DVELLSLE 108

配列番号 26 : ヒト F K B P 1 2 の D D ドメインに対応するアナウサギ F K

B P 1 2 のドメインの一例

MGVQVETISP GDGRTPKRG QTCVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFKFM LGKQEVIRGW 60
EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGATGHPG IIPPHATLVF DVELLKLE 108

配列番号 27 : ヒト F K B P 1 2 の D D ドメインに対応するラット F K B P

1 2 のドメインの一例

MGVEIETISP GDGRTPKKG QICVVHYTGM LQNGKKFDSS RDRNKPFKFR IGKQEVIKGF 60
EEGAAQMSLG QRAKLTCTPD VAYGATGHPG VIPPNATLIF DVELLNLE 108

配列番号 28 : D D r s タグの例

GVQVETISPG DGRTFPRRGQ TCVVHYTGML EDGRRVDSSR DRNRPFRFML GRQEVIRGWE 60
EGVSQMSVGQ RSRLTISPDY SYGSTGHPGI IPPHSTLVFD VELLRPE 107

請求の範囲

- [請求項1] マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムであって、
- ウイルスゲノムにコードされるPタンパク質は、D433、R434、およびK437のいずれか1以上またはすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異を含み、L511に対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異をさらに有していてもよく、L511の置換変異は、YまたはFへの変異である、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。
- [請求項2] 請求項1に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、ウイルスゲノムにコードされる前記Pタンパク質は、D433、R434、およびK437のすべてに対応するPタンパク質のアミノ酸に置換変異を有し、置換変異は、G、TおよびSのいずれかへの変異を含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。
- [請求項3] 請求項2に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、置換変異は、TまたはSへの変異である、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。
- [請求項4] 請求項3に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、置換変異は、Tへの変異である、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。
- [請求項5] 請求項3に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、置換変異は、Sへの変異である、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。
- [請求項6] 請求項1～3のいずれか一項に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、ウイルスゲノムにコードされる前記Pタンパク質が、

(1 S) D 4 3 3 S、R 4 3 4 A、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 F に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(2 S) D 4 3 3 S、R 4 3 4 A、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 Y に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(3 S) D 4 3 3 A、R 4 3 4 S、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 F に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(4 S) D 4 3 3 A、R 4 3 4 S、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 Y に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(5 S) D 4 3 3 A、R 4 3 4 A、K 4 3 7 S、および L 5 1 1 F に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(6 S) D 4 3 3 A、R 4 3 4 A、K 4 3 7 S、および L 5 1 1 Y に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(7 S) D 4 3 3 S、R 4 3 4 S、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 F に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(8 S) D 4 3 3 S、R 4 3 4 S、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 Y に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(9 S) D 4 3 3 S、R 4 3 4 A、K 4 3 7 S、および L 5 1 1 F に
対応するアミノ酸の変異を有する、

(10 S) D 4 3 3 S、R 4 3 4 A、K 4 3 7 S、および L 5 1 1 Y
に対応するアミノ酸の変異を有する、

(11 S) D 4 3 3 A、R 4 3 4 S、K 4 3 7 S、および L 5 1 1 F
に対応するアミノ酸

の変異を有する、

(12 S) D 4 3 3 A、R 4 3 4 S、K 4 3 7 S、および L 5 1 1 Y
に対応するアミノ酸の変異を有する、

(13 S) D 4 3 3 S、R 4 3 4 S、K 4 3 7 S、および L 5 1 1 F
に対応するアミノ酸の変異を有する、

(14 S) D 4 3 3 S、R 4 3 4 S、K 4 3 7 S、および L 5 1 1 Y

に対応するアミノ酸の変異を有する、

(1 T) D 4 3 3 T、R 4 3 4 A、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 F に対応するアミノ酸の変異を有する、

(2 T) D 4 3 3 T、R 4 3 4 A、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 Y に対応するアミノ酸の変異を有する、

(3 T) D 4 3 3 A、R 4 3 4 T、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 F に対応するアミノ酸の変異を有する、

(4 T) D 4 3 3 A、R 4 3 4 T、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 Y に対応するアミノ酸の変異を有する、

(5 T) D 4 3 3 A、R 4 3 4 A、K 4 3 7 T、および L 5 1 1 F に対応するアミノ酸の変異を有する、

(6 T) D 4 3 3 A、R 4 3 4 A、K 4 3 7 T、および L 5 1 1 Y に対応するアミノ酸の変異を有する、

(7 T) D 4 3 3 T、R 4 3 4 T、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 F に対応するアミノ酸の変異を有する、

(8 T) D 4 3 3 T、R 4 3 4 T、K 4 3 7 A、および L 5 1 1 Y に対応するアミノ酸の変異を有する、

(9 T) D 4 3 3 T、R 4 3 4 A、K 4 3 7 T、および L 5 1 1 F に対応するアミノ酸の変異を有する、

(10 T) D 4 3 3 T、R 4 3 4 A、K 4 3 7 T、および L 5 1 1 Y に対応するアミノ酸の変異を有する、

(11 T) D 4 3 3 A、R 4 3 4 T、K 4 3 7 T、および L 5 1 1 F に対応するアミノ酸の変異を有する、

(12 T) D 4 3 3 A、R 4 3 4 T、K 4 3 7 T、および L 5 1 1 Y に対応するアミノ酸の変異を有する、

(13 T) D 4 3 3 T、R 4 3 4 T、K 4 3 7 T、および L 5 1 1 F に対応するアミノ酸の変異を有する、

(14 T) D 4 3 3 T、R 4 3 4 T、K 4 3 7 T、および L 5 1 1 Y

に対応するアミノ酸の変異を有する、

(1ST) D433S、R434T、K437S、およびL511F
に対応するアミノ酸の変異を有する、または

(2ST) D433S、R434T、K437S、およびL511Y
に対応するアミノ酸の変異を有する、

マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターであって、ウイルスゲノム上にコードされるラージタンパク質(Lタンパク質)が、L1361CおよびL1558Iのいずれかまたは両方にアミノ酸に対応するアミノ酸の変異を有する、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[請求項8] 外来性の目的遺伝子を少なくとも1以上搭載した、請求項1～7のいずれか一項に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[請求項9] センダイウイルスまたはセンダイウイルスベクターである、請求項1～8のいずれか一項に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノム。

[請求項10] 請求項1～9のいずれか一項に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムをコードする核酸。

[請求項11] 請求項1～9のいずれか一項に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクターのRNAゲノムを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

[請求項12] ゲノム上にコードされるPタンパク質よりも温度感受性が弱いPタンパク質か、温度感受性を有しないPタンパク質を含む、請求項11に記載のマイナス鎖RNAウイルスまたはウイルスベクター。

[請求項13] ウイルスゲノム上にコードされるLタンパク質が温度感受性を有する場合には、ゲノム上にコードされるLタンパク質よりも温度感受性

が弱いタンパク質を含むか、または温度感受性を有しないタンパク質を含む、請求項 11 または 12 に記載のマイナス鎖 RNA ウイルスまたはウイルスベクター。

[請求項14] 請求項 11 ～ 13 のいずれか一項に記載のマイナス鎖 RNA ウイルスまたはウイルスベクターを含む、組成物。

[請求項15] 細胞に目的遺伝子を発現させる方法、目的遺伝子を発現した細胞を製造する方法、または、細胞を培養する方法であって、

当該細胞に請求項 11 ～ 13 のいずれか一項に記載のマイナス鎖 RNA ウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることと、

その後、第二の温度条件下でさらに培養し、これによりマイナス鎖 RNA ウイルスまたはウイルスベクターの一部またはすべてを前記細胞内から除去することを含む、方法。

[請求項16] 細胞に目的遺伝子を発現させる方法、目的遺伝子を発現した細胞を製造する方法、または、細胞を培養する方法であって、

当該細胞に請求項 11 ～ 13 のいずれか一項に記載のマイナス鎖 RNA ウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第一の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させることを含む、方法。

[請求項17] 細胞に目的遺伝子を発現させる方法、目的遺伝子を発現した細胞を製造する方法、または、細胞を培養する方法であって、

当該細胞に請求項 11 ～ 13 のいずれか一項に記載のマイナス鎖 RNA ウイルスまたはウイルスベクターを感染させて、その後、第二の温度条件下で培養し、前記目的遺伝子を前記細胞に発現させると共に、前記ウイルスまたはウイルスベクターを細胞内から除去することを

含む、
方法。

- [請求項18] 配列番号18に記載のアミノ酸配列に対して、4I、18K、50I、57K、59F、63A、68L、90V、98I、および105Rからなる群から選択される2以上またはすべてのアミノ酸変異と36Lに対応するアミノ酸変異を有するアミノ酸配列を有する、分解誘導性タンパク質。
- [請求項19] 配列番号18に記載のアミノ酸配列に対して、4I、18K、36L、50I、57K、59F、63A、68L、90V、98I、および105Rのすべてに対応するアミノ酸変異を有する、請求項18に記載の分解誘導性タンパク質。
- [請求項20] 目的タンパク質と請求項18または19に記載の分解誘導性タンパク質を含む、分解誘導性融合タンパク質。
- [請求項21] 請求項18～20のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする核酸。
- [請求項22] 請求項18～20のいずれか一項に記載のタンパク質、および／または、請求項21に記載の核酸を含む、動物細胞。
- [請求項23] 請求項18～20のいずれか一項に記載のタンパク質、および／または、請求項21に記載の核酸を含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクター。
- [請求項24] 請求項21に記載の核酸を含むマイナス鎖RNAゲノム含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクター。
- [請求項25] 配列番号19に記載のアミノ酸配列を有する、Mタンパク質。
- [請求項26] 請求項25に記載のMタンパク質をコードする核酸。
- [請求項27] 配列番号20に記載のアミノ酸配列を有する、HNタンパク質。
- [請求項28] 請求項27に記載のHNタンパク質をコードする核酸。
- [請求項29] 請求項25に記載のMタンパク質、および／または請求項27に記載のHNタンパク質を含む、動物細胞。

- [請求項30] 請求項25に記載のMタンパク質、および／または請求項27に記載のHNタンパク質を含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクター。
- [請求項31] 請求項26および／または27に記載の核酸を含む、動物細胞。
- [請求項32] 請求項26および／または27に記載の核酸を含むマイナス鎖RNAゲノムを含む、マイナス鎖RNAウイルスまたはベクター。
- [請求項33] 請求項26および／または27に記載の核酸を含むマイナス鎖RNAウイルスまたはベクターのゲノムをコードする核酸、または当該核酸を含むベクター。