

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7471821号
(P7471821)

(45)発行日 令和6年4月22日(2024.4.22)

(24)登録日 令和6年4月12日(2024.4.12)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K	35/15
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00
	Z N A	
請求項の数 24 (全126頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2019-557373(P2019-557373)	(73)特許権者	515045617 シアトル チルドレンズ ホスピタル (ディーピーエイ シアトル チルドレンズ リサーチ インスティテュート) アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン州, シアトル, ナインス アベニュー 1 9 0 0 1 9 0 0 Ninth Ave. Seattle, WA 9 8 1 0 1 U . S . A .
(86)(22)出願日	平成30年4月19日(2018.4.19)	(74)代理人	100077012 弁理士 岩谷 龍
(65)公表番号	特表2020-517268(P2020-517268 A)	(72)発明者	ローリングス, デイヴィッド, ジェイ . アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 1 2 シアトル, イー バレー ストリート 最終頁に続く
(43)公表日	令和2年6月18日(2020.6.18)		
(86)国際出願番号	PCT/US2018/028331		
(87)国際公開番号	WO2018/195297		
(87)国際公開日	平成30年10月25日(2018.10.25)		
審査請求日	令和3年4月19日(2021.4.19)		
(31)優先権主張番号	62/488,523		
(32)優先日	平成29年4月21日(2017.4.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 X L A 遺伝子療法用の最適化されたレンチウイルスベクター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の発現維持用ポリヌクレオチドであって、
(i) CBX3 遺伝子のエキソン 1 および CBX3 遺伝子の選択的エキソン 1 を含み、0.5 kb から 1 kb の範囲内の長さを有する遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE) をコードする第 1 の配列;
(ii) BTK プロモーターをコードする第 2 の配列; および
(iii) BTK をコードする第 3 の配列
を含むポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 3 に示される配列を含む エンハンサー をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記 UCOE が、0.7 kb 以下の長さである、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

第 1 の配列が、配列番号 1 に示される核酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

第 1 の配列が、配列番号 2 に示される核酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記BTKプロモーターが、配列番号 5 に示される核酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

第 3 の配列が、ヒトにおける発現用にコドン最適化されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

第 3 の配列が、配列番号 6 に示される配列を含む、請求項 7 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

第 3 の配列が、配列番号 7 に示される配列を含む、請求項 7 に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 10】

前記UCOEが逆方向である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記UCOEが順方向である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 13】

ウイルスベクターである、請求項 12 に記載のベクター。

【請求項 14】

レンチウイルスベクターである、請求項 12 または 13 に記載のベクター。

20

【請求項 15】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 16】

B 細胞である、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 17】

骨髄系細胞である、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 18】

造血幹細胞である、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 19】

CD34⁺造血幹細胞である、請求項 15 に記載の細胞。

30

【請求項 20】

請求項 15 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む、B 細胞の生存、増殖および / または分化の促進用組成物。

【請求項 21】

請求項 15 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む、X連鎖無グロブリン血症 (XLA) またはXLAに伴う症状の治療、抑制または緩和用組成物。

【請求項 22】

前記細胞が、投与対象の自家細胞である、請求項 20 または 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

養子細胞移入により対象に投与されるように適合された、請求項 20 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 24】

免疫グロブリン置換療法および抗微生物剤から選択される別の治療法と併用して、対象に投与されるように適合された、請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先出願の参照による引用

本出願は、2017年4月21日に出願された米国仮特許出願第62/488,523号に基づく優

50

先権を主張するものである。この出願に開示された内容は、参照によりその全体が本明細書に明示的に援用される。

【0002】

連邦資金に関する陳述

本発明は、米国国立衛生研究所傘下の米国国立アレルギー感染症研究所によって付与された助成金第A1084457号に基づく支援を受けてなされたものである。

【0003】

配列表の参照

本願は電子形式の配列表とともに出願されたものである。この配列表は、Sequence Listing SCRI.148WO.txtというファイル名で2018年4月17日に作成された140kbのファイルとして提供されたものである。この電子形式の配列表に記載の情報は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

10

【0004】

本発明の態様は、X連鎖無グロブリン血症(XLA)を治療、抑制または緩和するための治療法の恩恵を受け得る対象として特定または選択された対象において、XLAを治療、抑制または緩和するための組成物および方法に関する。代表的な態様は、ブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)の発現を回復または増加させる遺伝子療法用構築物および遺伝子療法の方法を含む。

【背景技術】

【0005】

X連鎖無グロブリン血症(XLA)は、ブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)遺伝子の変異に起因する稀なX連鎖性遺伝子疾患である。BTK遺伝子に変異を起こした個体では、成熟B細胞が発生せず、成熟が停止したB細胞は、B細胞抗原受容体の結合やその他の細胞シグナルに応答性を示さない。XLAに罹患した男性は、病原体の攻撃に対して感染防御抗体による応答を惹起することができず、最終的にはウイルス感染症や細菌性感染症により死亡してしまう。現在の治療法は過去50年間で変化しておらず、免疫グロブリン置換療法と標的化抗微生物剤からなる治療が行われている。この治療法を実施しても、XLA患者は慢性感染症に頻繁に罹り、疾患を引き起こしたり命に関わったりするような様々な合併症のリスクが増加している。稀にはあるが、コンディショニングを行わずに、あるいは強度減弱コンディショニングを行ってXLA患者に幹細胞を移植する治療がなされているが、そのアウトカムは一定しない。XLAを抑制、治療または緩和するためのさらなる治療法が必要とされている。

20

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

プロモーター、インスレーターおよびエンハンサーの各候補、ならびにコドン最適化したヒトBTK cDNA構築物の設計と試験を繰り返し、この結果に基づき、(マウスまたはヒトの)造血幹細胞に由来するB細胞および骨髄系細胞においてBTKの発現を維持することが可能な、レンチウイルス(LV)を用いた新規ベクター構築物を特定し、これを作製した。この新規ベクター構築物については、本発明の実施形態において述べている。本発明の実施形態によるベクター構築物を、エクスピボにおいてBTK欠損宿主に形質導入および移植したところ、驚くべきことに、BTKの発現が維持され、B細胞の発生が回復することが示された。本明細書に記載の代表的な実施形態のいずれかに示すように、本明細書に記載の構築物は、末端切断型遍在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)と、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座のイントロン領域に由来する保存されたエンハンサーエレメントとを利用しており、コドン最適化されたヒトBTK cDNAの発現を誘導することができる。

40

【0007】

この構築物を使用したレンチウイルス(LV)ベクターは、マウス遺伝子療法実験の一次移植レシピエントおよび二次移植レシピエントにおいて、ウイルスによる毒性を認めるこ

50

となく、B細胞および骨髄系細胞におけるBTKの発現を維持し、B細胞の発生および機能を回復させることが示された。したがって、この構築物は、ヒトXLAを治療、抑制または緩和するための、遺伝子療法用のユニークなLVベクターである。

【0008】

第1の態様において、ブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)の発現維持用ポリヌクレオチドであって、遍在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)をコードする第1の配列;プロモーターをコードする第2の配列;およびBTKをコードする第3の配列を含むポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、前記UCOEは、2 kb、1.5 kb、1 kb、0.75 kb、0.5 kbもしくは0.25 kb、またはこれらの数値のいずれか2つによって定義される範囲内の長さ(kb)である。いくつかの実施形態において、第1の配列は、配列番号1および/または配列番号2に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターはBTKプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記BTKプロモーターは、配列番号5に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3の配列は、ヒトにおける発現用にコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、第3の配列は、配列番号6または配列番号7に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターはB細胞特異的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは、B細胞特異的プロモーターB29を含む。いくつかの実施形態において、前記B29プロモーター配列は、配列番号46に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは内在性プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記ポリペプチドは1つ以上のエンハンサーエレメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも1つのDNase高感受性領域(DHS)を含む。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、DNase高感受性領域1(DHS1)、DNase高感受性領域2(DHS2)、DNase高感受性領域3(DHS3)、DNase高感受性領域4(DHS4)および/またはDNase高感受性領域5(DHS5)である。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、配列番号3に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも1つのイントロン領域を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座のイントロン4、イントロン5および/またはイントロン13である。いくつかの実施形態において、前記イントロン領域は、配列番号9に示される配列(イントロン4)、配列番号10に示される配列(イントロン5)および/または配列番号11に示される配列(イントロン13)を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号4、配列番号14または配列番号15に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記UCOEは逆方向または順方向である。いくつかの実施形態において、前記UCOEは順方向である。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号16に示される配列、配列番号17に示される配列、配列番号18に示される配列、配列番号19に示される配列、および/または配列番号20に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、BTKプロモーターの上流の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、BTKプロモーターの上流の前記遺伝子は、BTKエンハンサーである。いくつかの実施形態において、前記BTKエンハンサーは、配列番号21または配列番号22に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に示される配列を含む。

【0009】

第2の態様において、細胞におけるBTKの発現維持用ベクターであって、遍在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)をコードする第1の配列;プロモーターをコードする第2の配列;およびBTKをコードする第3の配列を含むベクターを提供する。いくつ

かの実施形態において、第1の配列は、配列番号1および/または配列番号2に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターはBTKプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、配列番号5に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3の配列は、ヒトにおける発現用にコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、第3の配列は、配列番号6または配列番号7に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターはB細胞特異的プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは、B細胞特異的プロモーターB29を含む。いくつかの実施形態において、前記B29プロモーター配列は、配列番号46に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは内在性プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは1つ以上のエンハンサーエレメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも1つのイントロン領域を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、DNase高感受性領域(DHS)を含む。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、DNase高感受性領域1(DHS1)、DNase高感受性領域2(DHS2)、DNase高感受性領域3(DHS3)、DNase高感受性領域4(DHS4)および/またはDNase高感受性領域5(DHS5)である。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、配列番号3に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座のイントロン4、イントロン5および/またはイントロン13である。いくつかの実施形態において、前記イントロン領域は、配列番号9に示される配列(イントロン4)、配列番号10に示される配列(イントロン5)および/または配列番号11に示される配列(イントロン13)を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号4、配列番号14または配列番号15に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記UCOEは逆方向または順方向である。いくつかの実施形態において、前記UCOEは順方向である。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、B細胞系特異的レンチウイルスベクターを用いたベクターである。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34⁺造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号16に示される配列、配列番号17に示される配列、配列番号18に示される配列、配列番号19に示される配列、および/または配列番号20に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、BTKプロモーターの上流の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、BTKプロモーターの上流の前記遺伝子は、BTKエンハンサーである。いくつかの実施形態において、前記BTKエンハンサーは、配列番号21または配列番号22に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に示される配列を含む。

【0010】

第3の態様において、BTK発現用細胞であって、UCOEをコードする第1の配列；プロモーターをコードする第2の配列；およびBTKをコードする第3の配列を含むポリヌクレオチドを含む細胞を提供する。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、ベクターに組み込まれている。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34⁺造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に

示される配列を含む。

【0011】

第4の態様において、B細胞の生存、増殖および/または分化の促進または増強を必要とする対象において、B細胞の生存、増殖および/または分化を促進または増強する方法であって、本発明の実施形態のいずれか1つに記載の細胞、または本発明の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドもしくは本発明の実施形態のいずれか1つに記載のベクターを含む細胞を前記対象に投与すること、任意で、前記細胞を投与する前に、B細胞の生存、増殖および/もしくは分化を促進し得る治療法の恩恵を受け得る対象として前記対象を特定もしくは選択すること、ならびに/または任意で、前記細胞を投与した後に、前記対象もしくは該対象から得られた生体試料において、B細胞の生存、増殖および/もしくは分化を測定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記細胞は前記対象から得られたものであり、該細胞は、本発明の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドまたは本発明の実施形態のいずれか1つに記載のベクターを導入することによって遺伝子組換えされている。いくつかの実施形態において、前記投与は養子細胞移入によって行われる。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34+造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記対象は雄性である。いくつかの実施形態において、前記対象はX連鎖無グロブリン血症(XLA)に罹患している。いくつかの実施形態において、前記対象は、免疫グロブリン置換療法を受けるべき対象として選択された対象である。いくつかの実施形態において、前記対象は、標的化抗微生物剤を投与すべき対象として選択された対象である。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に示される配列を含む。

10

20

【0012】

第5の態様において、X連鎖無グロブリン血症(XLA)またはXLAに伴う症状の治療、抑制または緩和を必要とする対象において、XLAまたはXLAに伴う症状を治療、抑制または緩和する方法であって、本発明の実施形態のいずれか1つに記載の細胞、または本発明の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドもしくは本発明の実施形態のいずれか1つに記載のベクターを含む細胞を前記対象に投与すること、任意で、XLAもしくはXLAに伴う症状に対する治療法の恩恵を受け得る対象として前記対象を特定もしくは選択すること、および/または任意で、前記対象において、XLAの進行の改善もしくはXLAに伴う症状の改善を測定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記細胞は前記対象から得られたものであり、該細胞は、本発明の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドまたは本発明の実施形態のいずれか1つに記載のベクターを導入することによって遺伝子組換えされている。いくつかの実施形態において、前記投与は養子細胞移入によって行われる。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34+造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記対象は雄性である。いくつかの実施形態において、前記対象は、免疫グロブリン置換療法を受けるべき対象として選択された対象である。いくつかの実施形態において、前記対象は、標的化抗微生物剤を投与すべき対象として選択された対象である。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に示される配列を含む。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】XLA用に最適化された遺伝子送達プラットフォームを示す。

【0014】

【図2】XLAの遺伝子療法用レンチウイルスベクターの最適化方法を示す。

50

【 0 0 1 5 】

【 図 3 】 前臨床モデルにおいて治療計画を実施する方法を示す。

【 0 0 1 6 】

【 図 4 】 いずれもヒトBTKを発現する0.7UCOEレンチウイルスベクターまたは0.7UCOE-I4,5レンチウイルスベクターを移入したXLAマウスから得た各リンパ球サブセット（骨髄（BM）B細胞、脾臓（SP）B細胞、腹腔液（PF）B細胞、単球および好中球）におけるBTKの発現をフローサイトメトリーで測定し、コントロールBTK⁺集団に対する割合（%）として示した。

【 0 0 1 7 】

【 図 5 】 B細胞の発生と機能の回復を示す。一次レシピエントから得た各B細胞サブセットにおいてBTKの発現を分析した結果を示す。脾臓の各B細胞サブセット（右のパネル）を最も未熟なサブセットから成熟したサブセットの順で示す。具体的には、早期B細胞の発生（プレB細胞、プロB細胞、未熟B細胞および成熟B細胞）から後期B細胞の発生（1型移行期（T1）B細胞、2型移行期（T2）B細胞、辺縁帯前駆（MZP）B細胞、辺縁帯（MZ）B細胞、および濾胞成熟（FM）B細胞）の順で示す。

10

【 0 0 1 8 】

【 図 6 】 0.7UCOE.BTKp.BTKベクターおよび0.7UCOE I-4,5 BTKp.BTKは、いずれもB細胞の発生と機能を回復することを示す。（A）脾臓B細胞の絶対数を示す（右のパネル）。（B）IgM刺激に应答したB細胞の増殖を示す。ナイーブB細胞を可溶性IgMで刺激した。72時間後における増殖BTK⁺B細胞の割合（%）をWT Mockで正規化して示す。

20

【 0 0 1 9 】

【 図 7 】 T細胞依存的抗原による免疫化に対する应答と自己抗体の産生を示す。（A）アラム（Alum）を加えたNP-CGGで免疫化したマウスの血清中のNP特異的IgGをELISAで検出し、IgG標準品と比較してその濃度を定量し、累積データとして示した。ELISAを使用して、免疫前（-）、一次免疫後（1⁰）および再投与すなわち二次免疫後（2⁰）における高親和性NP特異的IgGの濃度を検出した。（B）実験のエンドポイントにおいて、各ベクターで処置したマウスの血清中の抗dsDNA IgG濃度および抗dsDNA IgG2c濃度をELISAで測定し、吸光度の測定値（OD450）として示した。ポジティブコントロールとして、自己免疫疾患WAS^{-/-}キメラマウスから得た血清を使用する（黒色の三角）。

【 0 0 2 0 】

【 図 8 】 細胞1個あたりのウイルスの組み込み数を示す。（A）一次移植マウスの細胞1個あたりのウイルスの平均組み込み数をqPCRで測定した。全骨髄細胞におけるウイルスの平均組み込み数を示し、脾臓CD43⁻細胞（B細胞）と脾臓CD43⁺細胞（非B細胞）とでウイルスの平均組み込み数を比較した。（B）一次移植マウスの脾臓CD43⁻B細胞集団において、BTK⁺B細胞の割合（%）を平均ウイルス組み込み数で除したものを示す。データは、6回の独立した実験の平均値±SEMを示し、n=9（WT Mock）、n=10（XLA Mock）、n=16（0.7UCOE.BTKp）、n=14（0.7UCOE.INT4,5 BTKp）とした。

30

【 0 0 2 1 】

【 図 9 】 4種のレンチウイルス（LV）構築物の発現プロファイルと、一次レシピエントマウスにおけるB細胞の発生と機能の回復を示す。（図9A）マウス細胞においてヒトBTKを発現させるために使用した、RRLバックボーンを持つ各レンチウイルス構築物の模式図を示す。これらのレンチウイルス構築物は、BTKプロモーター（BTKp）、1.5kbの偏在性クロマチンオープニングエレメント（UCOE）またはE μ エンハンサー、およびコドン最適化されたヒトBTK cDNA（co）を含んでいた。（図9B）遺伝子療法で処置したマウスの骨髄、脾臓および腹腔から得たB細胞および骨髄系細胞のBTKマーカーをフローサイトメトリーで測定し、BTK⁺集団の割合（%）として示した。（データは、10回の独立した実験の平均値±SEMを示し、n=14（WT Mock）、n=12（KO Mock）、n=5（BTKp）、n=24（1.5kb.UCOE.BTKp）、n=18（1.5kb.UCOE.BTKp.co）、n=21（E μ .BTKp）とした。）（図9C～図9E）骨髄、脾臓および腹腔のB細胞（B220⁺）を、B細胞サブセットの表面マーカーで染色し、生リンパ球の数またはその割合（%）を分析した。（図

40

50

9 C) 早期 B 細胞の発生 (プロ B 細胞 (CD43+, IgM-), プレ B 細胞 (CD43-, IgM-, IgD-), 未熟 B 細胞 (CD43-, IgM+IgD-) および成熟 B 細胞 (CD43-, IgM+, IgD+)) を示す。(図 9 D) 後期 B 細胞の発生 (1 型移行期 (T1) B 細胞 (CD24hi, CD21-), 2 型移行期 (T2) B 細胞 (CD24hi, CD21int), 辺縁帯 / 辺縁帯前駆 (MZ / MZP) B 細胞 (CD24hi, CD21hi) および濾胞成熟 (FM) B 細胞 (CD24int, CD21int)) を示す。(図 9 E) 腹腔内 B 細胞 (B2 細胞 (B220hi), B1b 細胞 (B220lo, CD5-) および B1a 細胞 (B220lo, CD5+)) を示す。データは、10 回の独立した実験の平均値 ± SEM を示し、n=11 (骨髄)、n=13 (脾臓)、n=14 (腹腔液) (WT Mock); n=10 (骨髄)、n=11 (脾臓)、n=10 (腹腔液) (KO Mock); n=5 (骨髄)、n=5 (脾臓)、n=5 (腹腔液) (BTKp); n=20 (骨髄)、n=21 (脾臓)、n=22 (腹腔液) (UCOE.BTKp); n=14 (骨髄)、n=14 (脾臓)、n=17 (腹腔液) (UCOE.BTKp.co); n=18 (骨髄)、n=19 (脾臓)、n=20 (腹腔液) (Eμ.BTKp) とした。(図 9 F) 各ベクターで処置したマウスから得た全脾細胞を、培地のみ、抗マウス IgM、LPS または PMA / イオノマイシンで刺激し、³H - チミジンの取り込みにより増殖を測定し、3 連のウェルを平均した 1 分間あたりのカウント数 (cpm) として示した。データは、5 回の独立した実験の平均値 ± SEM を示し、n=10 (WT Mock)、n=7 (KO Mock)、n=5 (BTKp)、n=13 (1.5kbUCOE.BTKp)、n=9 (1.5kbUCOE.BTKp.co)、n=10 (Eμ.BTKp) とした。(図 9 G ~ 図 9 H) 各ベクターで処置したマウスの血清中の総 IgG 濃度 (図 9 G) および総 IgM 濃度 (図 9 H) を ELISA で測定した。データは、4 回の独立した実験の平均値 ± SEM を示し、n=9 (WT Mock)、n=10 (KO Mock)、n=2 (BTKp)、n=19 (1.5kbUCOE.BTKp)、n=14 (1.5kbUCOE.BTKp.co)、n=16 (Eμ.BTKp) とした。(図 9 I) アラム (Alum) を加えた NP-CGG で免疫化したマウスの血清中の NP 特異的 IgG 濃度を ELISA で測定し、IgG 標準品に対する相対量として示した。ELISA を使用して、免疫前 (-)、免疫後 (+) およびその後の再投与後 (++) における低親和性 NP 特異的 IgG の濃度 (補足資料参照) および高親和性 NP 特異的 IgG の濃度 (i) を検出した。データは、5 回の独立した実験の平均値 ± SEM を示し、n=9 (WT Mock)、n=10 (KO Mock)、n=2 (BTKp)、n=19 (1.5kbUCOE.BTKp)、n=14 (1.5kbUCOE.BTKp.co)、n=16 (Eμ.BTKp) とした。図に示した実験群および KO Mock 群から得た全 B 細胞間または B 細胞サブセット間において、***P = 0.001; **P = 0.001 ~ 0.01; *P = 0.01 ~ 0.05 とした。

【0022】

【図 10】 Eμ.BTKp 遺伝子療法で処置したマウスが広範な特異性を有する様々な自己反応性 IgG 抗体を産生することを示す。(a) 免疫化を行う前に、各ベクターで処置したマウスの血清中の抗 dsDNA IgG 濃度を ELISA で測定し、吸光度の測定値 (OD450) として示した。データは、10 回の独立した実験の平均値 ± SEM を示し、n=18 (WT Mock)、n=16 (KO Mock)、n=6 (BTKp)、n=30 (1.5kbUCOE.BTKp)、n=18 (1.5kbUCOE.BTKp.co)、n=29 (Eμ.BTKp)、n=2 (WASp コントロール) とした。(b) Eμ.BTKp で処置したマウス (n=23) において、抗 dsDNA IgG のサブクラスの IgG2c および IgG3 を ELISA で測定した。(c) Eμ.BTKp で処置した 9 匹のマウスの血清中における抗 dsDNA IgG サブクラスの濃度を ELISA で測定した。図に示した実験群間において、***P = 0.001; **P = 0.001 ~ 0.01; *P = 0.01 ~ 0.05 とした。

【0023】

【図 11】 1.5kbUCOE.BTKp ベクターおよび 1.5kbUCOE.BTKp.co ベクターは、一次レシピエントおよび二次レシピエントにおいて、コピー数が少なくても BTK の発現を維持することを示す。二次移植マウスから得た脾臓の顆粒球 (CD11b+, GR1hi) において BTK+ 細胞が占める割合 (%) をフローサイトメトリーで評価した。(a) 二次移植レシピエントにおける BTK+ 顆粒球の割合 (%) を分析した結果を示すグラフである。データは、3 回の独立した実験の平均値 ± SEM を示し、n=3 (WT Mock)、n=2 (KO Mock)、n=3 (BTKp)、n=8 (1.5kbUCOE.BTKp)、n=7 (Eμ.BTKp) とした。(b) 一次移植マウスの脾細胞において、BTK+ 顆粒球の割合 (%) を平均ウイルス組み込み数で除したものを示す。(c ~ d) 一次移植マウスおよび二次移植マウスの骨髄 (c) および脾細胞 (d) に

10

20

30

40

50

おける細胞 1 個あたりの平均ウイルス組み込み数を qPCR で測定した。データは、8 回の一次移植実験および 3 回の二次移植実験の平均値 \pm SEM を示し、 $n=5$ (一次移植実験)、 $n=3$ (二次移植実験) (BTKp) ; $n=18$ (一次移植実験)、 $n=8$ (二次移植実験) (UCOE.BTKp) ; $n=10$ (一次移植実験)、 $n=1$ (二次移植実験) (UCOE.BTKp.co) ; $n=18$ (一次移植実験)、 $n=7$ (二次移植実験) ($E\mu$.BTKp) とした。図に示した実験群間において、***P 0.001 ; **P=0.001 ~ 0.01 ; *P=0.01 ~ 0.05 とした。

【0024】

【図12】0.7kb UCOE.BTKp.co レンチウイルスを使用した遺伝子療法で処置したマウスでの、罹患した造血細胞系列における BTK の発現の回復と、該マウスにおける B 細胞の発生を示す。移植の 16 ~ 25 週間後における、各 B 細胞サブセット中の BTK+ 細胞の割合と、再構成された各 B 細胞サブセットの細胞数を評価した。(a) 0.7kb の偏在性クロマチンオープンエレメント (UCOE) を含む RRL バックボーンを持ち、コドン最適化されたヒト BTK を発現する レンチウイルス構築物の模式図を示す。(b ~ c) 遺伝子療法で処置した群から得た骨髄 (b) および脾臓 (c) の各リンパ球サブセット (好中球、単球、B 細胞および T 細胞) における BTK+ 細胞の割合 (%) をフローサイトメトリーで測定した。データは、7 回の独立した実験の平均値 \pm SD を示し、 $n=13$ (WT Mock)、 $n=12$ (KO Mock)、 $n=36$ (0.7kb.UCOE.BTKp.co) とした。(d) 脾臓から得た好中球 (CD11b+GR1+)、単球 (CD11b+)、B 細胞 (B220+) および T 細胞 (CD4+CD8+) における BTK の発現を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。(e) 腹腔内 B 細胞 (CD19+) および各 B 細胞サブセット (B1a 細胞 (CD5-CD43+)、B1b 細胞 (CD5+CD43+) および B2 細胞 (CD5-CD43-)) における BTK の発現を示す。 $n=2$ (WT Mock)、 $n=2$ (KO Mock)、 $n=8$ (0.7kb.UCOE.BTKp.co) とした 7 回の独立した実験の代表的なデータを標準偏差 (SD) とともに示す。(f) 各サブセットにおける BTK の発現をフローサイトメトリーで測定したところ、BTK が発現したことにより B 細胞の発生が回復したことが示された。早期 B 細胞の発生 (プロ B 細胞 (CD43+、IgM-)、プレ B 細胞 (CD43-、IgM-、IgD-)、未熟 B 細胞 (CD43-、IgM+IgD-) および成熟 B 細胞 (CD43-、IgM+、IgD+))、ならびに後期 B 細胞の発生 (1 型移行期 (T1) B 細胞 (CD24hi、CD21-)、2 型移行期 (T2) B 細胞 (CD24hi、CD21int)、辺縁帯 / 辺縁帯前駆 (MZ/MZP) B 細胞 (CD24hi、CD21hi)、および濾胞成熟 (FM) B 細胞 (CD24int、CD21int)) を示す。 $n=13$ (WT Mock)、 $n=12$ (KO Mock)、 $n=36$ (0.7kb.UCOE.BTKp.co) とした 7 回の独立した実験の累積データを示す。(g ~ h) 骨髄 (g) および脾臓 (h) における各 B 細胞サブセットの総細胞数を示す。(i) 腹腔液中のリンパ球集団全体に占める各 B 細胞サブセットの割合 (%) を示す。データは、2 回の独立した実験の平均値 \pm SD を示し、 $n=4$ (WT Mock)、 $n=4$ (KO Mock)、 $n=11$ (0.7kb.UCOE.BTK.co) とした。アスタリスク (*) は、KO Mock と 0.7kb.UCOE.BTK.co の間で有意差があることを示す。P 値は、Sidak 法を使用した一元配置分散分析により算出した (***P 0.001 ; **P=0.001 ~ 0.01 ; *P=0.01 ~ 0.05)。

【0025】

【図13】0.7.UCOE.Bkp.co レンチウイルスを用いた遺伝子療法を実施後の、一次レシピエントにおける B 細胞の機能の再構成を示す。骨髄移植の 16 ~ 25 週間後に実施した B 細胞機能アッセイの結果を示す。スケールバーは平均値 \pm SD を示す。(a) 抗マウス IgM 抗体、LPS または PMA / イオノマイシンを加えて B 細胞 (CD43-脾細胞) を 72 時間インキュベートした後、1 回以上細胞分裂した B 細胞の割合 (%) を示す (CFSE の希釈により測定し、フローサイトメトリーで分析した)。 $n=4$ (WT Mock)、 $n=3$ (KO Mock) および $n=5$ (0.7.UCOE.BTKp.BTK.co) とした 1 回の独立した実験の代表的なデータを示す。(b) IgM で刺激した 72 時間後に、CFSE 標識 B 細胞 (CD43-脾細胞) を、生細胞集団と B220+ 細胞集団でゲーティングしたフローサイトメトリー分析を示す (フローサイトメトリープロット作成中)。(c) アラム (Alum) を加えた NP-CGG で免疫化したマウスの血清中の高親和性 NP 特異的 IgG 濃度を ELISA で測定した結果を示す。各濃度は、免疫前 (-)、免疫後 (+) およびその後の再投与後 (++) に測定する。データは、7 回の独立

10

20

30

40

50

した実験を示し、一次免疫 (+) では、n=11 (WT Mock)、n=10 (KO Mock)、n=13 (0.7kb.UCOE.BTKp.co) とし、再投与 (++) では、n=3 (WT Mock)、n=3 (KO Mock)、n=3 (0.7kb.UCOE.BTKp.co) とした。移植の16~25週間後に、一次免疫化レシピエントの血清中の (d) 総IgG濃度および総IgM濃度ならびに (e) 抗dsDNA抗体濃度をELISAで測定した。データは、7回の独立した実験から得たものであり、n=10 (WT Mock)、n=8 (KO Mock) およびn=26 (0.7.UCOE.BTKp.BTK.co.) とした。ポジティブコントロールとして、血清中の抗DNA抗体濃度が高い2種のWAS自己免疫キメラの血清を使用した (e)。P値は、Sidak法を使用した一元配置分散分析により算出した (**P=0.001; **P=0.001~0.01; *P=0.01~0.05)。

【0026】

【図14】遺伝子療法で処置した骨髄細胞をTBK^{-/-}二次レシピエントに連続継代移植しても、ウイルスコピー数およびBTKの発現は維持されることを示す。一次レシピエントから得た骨髄を二次レシピエントに移植し、16週間後に骨髄 (a) および脾臓 (b) の罹患した細胞系列におけるBTK+発現細胞の割合 (%) をフローサイトメトリーで測定した。データは、2回の独立した実験を示し、n=4 (WT Mock)、n=4 (KO Mock)、n=19 (0.7UCOE.BTKp.BTKco) とした。 (c) 一次レシピエントから得た全骨髄細胞、脾臓B細胞 (CD43-) および脾臓非B細胞 (CD43+) から抽出したゲノムDNAをqPCRで分析することによって測定したウイルスコピー数 (VCN) を示す。 (d) 二次レシピエントマウスから得た全骨髄細胞および脾細胞におけるウイルスコピー数を示す。各ドットは1匹のマウスを示す。データは、一次レシピエント (n=21、0.7.UCOE.BTKp.BTK.co) および二次レシピエント (n=11、0.7.UCOE.BTKp.BTK.co) に対して行った7回の独立した実験から得た。 (e) 一次レシピエントおよび二次レシピエントの脾臓から抽出したゲノムDNAにおいてメチル化を評価した。一次レシピエントは、n=2 (BTKp.BTK)、n=5 (1.5kb UCOE.BTKp.BTK)、n=6 (Eμ.BTKp.BTK) およびn=6 (0.7kb.UCOE.BTKp.co) とした。二次レシピエントは、n=4 (1.5kb.UCOE.BTKp.BTK) およびn=6 (0.7UCOE.BTKp.co) とした。いずれのパネルも平均値±SDを示し、P値はKO Mockの平均値と0.7.UCOE.BTKp.BTK.coの平均値を比較したものである。P値は、Sidak法を使用した一元配置分散分析により算出した (**P=0.001; **P=0.001~0.01; *P=0.01~0.05)。

【0027】

【図15】0.7UCOE.BTKp.coベクターが、XLAに罹患したCD34細胞において少ないコピー数でBTKの発現を持続することを示す。XLAに罹患したCD34細胞およびコントロールCD34細胞に、様々な感染多重度 (MOI) で0.7UCOE.BTKp.coを形質導入し、インビトロで15日間培養した。 (a) 正常CD34細胞およびXLAに罹患したCD34細胞へのレンチウイルスによる形質導入のプロトコルを示す模式図である。100ngのヒトTPO、ヒトSCFおよびヒトFlt3を添加したSCGM培地中で細胞を48時間刺激した。0.7UCOE.BTKp.coを細胞に形質導入し、15日間培養して増殖させた。15日目に、BTKの発現およびウイルスコピー数について細胞を分析した。 (b) XLA患者から採取したCD34細胞を様々なMOIで形質導入し、15日後にBTK染色した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。 (c) 形質導入の24時間後にフローサイトメトリーで測定した形質導入細胞の生存率を示す。 (d) 15日間培養した後に回収した全細胞からゲノムDNAを抽出し、qPCRで分析することによって測定したウイルスコピー数 (VCN) を示す。データは、2連のウェルで実施した3回の独立した実験から得た平均値±SDを示す。各ドットは、一人の健常ドナーまたはXLAドナーを示す。

【0028】

【図16】BTKプロモーターが、マウスにおいて内在性BTKの発現パターンを模倣することを示す。 (a~b) 骨髄、脾臓、腹腔洗浄液、末梢血および胸腺を野生型マウスから採取し、各細胞のB細胞マーカー、骨髄系細胞マーカー、T細胞マーカー、NK細胞マーカー、および細胞内BTKを染色し、フローサイトメーターで測定した。凡例に示すように、様々な組織から得た各試料を様々な形の記号で示す。各サブセットにおけるBTK+細胞の割合 (%) (a) と、これらのBTK+細胞の蛍光強度の中央値 (b) を示す。 (c) B29プロモ

10

20

30

40

50

ーター（上のパネル）または内在性BTKプロモーター-BTKp（下のパネル）の制御下に、RRLバックボーン、E μ エンハンサーおよびヒトBTK cDNAを組み込んだレンチウイルス構築物の模式図を示す。（d～e）E μ .B29またはE μ .BTKpを用いた遺伝子療法で処置したKOマウスから骨髄細胞、脾細胞および腹腔細胞を採取し、B細胞マーカー（CD11b⁻、B220⁺）、骨髄系細胞マーカー（CD11b⁺）、T細胞マーカー（CD11b⁻、CD3⁺）、細胞内BTKを染色し、フローサイトメトリーで分析した。（d）BTK⁺細胞の割合（%）を示す。（e）図に示した細胞集団におけるBTK染色の蛍光強度の中央値を示す。データは、n=4（E μ .B29）およびn=5（E μ .BTKp）とした2回の独立した実験の平均値 \pm SEMを示す。E μ .B29とE μ .BTKpの間において、***P 0.001；**P=0.001～0.01；*P=0.01～0.05とした。

10

【0029】

【図17】（a）T2Aに連結されたGFPに融合した野生型またはコドン最適化されたヒトBTK cDNAとE μ エンハンサーを含み、BTKプロモーターの制御下にあるレンチウイルス構築物の模式図を示す。（b）ニワトリBTK^{-/-}DT40細胞にBTK-GFP構築物またはcoBTK-GFP構築物を形質導入した。ヒストグラムはGFPおよびBTKの発現を示す。（c）BTK-GFP形質導入細胞およびcoBTK-GFP形質導入細胞を、Indo-1エステルAM蛍光色素で染色し、抗IgMで刺激した。カルシウムの動員をフローサイトメトリーにより観察した。

【0030】

【図18】（a）遺伝子療法で処置したKOマウスから得た末梢血中のB細胞および骨髄系細胞におけるBTKの発現をフローサイトメトリーで分析した代表的なプロットを示す。（b）遺伝子療法で処置したマウスの骨髄、脾臓および腹腔からB細胞および骨髄系細胞を採取し、各細胞のBTKマーカーをフローサイトメトリーで測定し、BTK⁺細胞の蛍光強度の中央値を示した。（データは、10回の独立した実験の平均値 \pm SEMを示し、n=14（WT Mock）、n=12（KO Mock）、n=5（BTKp）、n=24（1.5kb.UCOE.BTKp）、n=18（1.5kb.UCOE.BTKp.co）、n=21（E μ .BTKp）とした。）（c）遺伝子療法で処置したマウスの骨髄細胞を早期B細胞発生マーカーで染色した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。（d）Hardy分類に従った分画I（IgM^{lo}、IgD^{hi}）、分画II（IgM^{hi}、IgD^{hi}）、分画III（IgM^{hi}、IgD^{lo}）（この順で成熟度が低下する）に含まれるB細胞の割合（%）を示すグラフである。各層のリングは1匹のマウスを示し、各分画中のB細胞の割合の平均値（%）を円グラフの中に示す。データは、11回の独立した実験の平均値 \pm SEMを示し、n=18（WT Mock）、n=14（KO Mock）、n=7（BTKp）、n=43（1.5kb.UCOE.BTKp）、n=18（1.5kb.UCOE.BTKp.co）、n=23（E μ .BTKp）とした。（e～f）アラム（Alum）を加えたNP-CGGによる免疫化の前（-）およびその後（+）において、各ベクターで処置したマウスの血清中のNP特異的IgG濃度をELISAで測定し、IgG標準品に対する相対量として示した。すべての群（e）および各マウス（f）における低親和性NP特異的抗体を示す。データは、5回の独立した実験の平均値 \pm SEMを示し、n=9（WT Mock）、n=10（KO Mock）、n=2（BTKp）、n=19（1.5.UCOE.BTKp）、n=14（1.5kb.UCOE.BTKp.co）、n=16（E μ .BTKp）とした。（g）TNP-Ficolで免疫化したマウスの血清中のTNP特異的IgM濃度をELISAで測定し、IgM標準品に対する相対量として示した。データは、3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを示し、n=4（WT）、n=6（WT Mock）、n=4（KO）、n=3（KO Mock）、n=14（UCOE.BTKp）とした。各グラフに示した実験群とKO Mock群の間において、***P 0.001；**P=0.001～0.01；*P=0.01～0.05とした。

20

30

40

【0031】

【図19】（a）高力価または低力価の抗dsDNA IgGを産生するE μ .BTKp一次移植マウスをコントロールと比較した生存曲線を示す。（b）E μ .BTKp一次移植マウスにおいて、フローサイトメトリーで測定したBTK⁺細胞におけるBTKのMFIとELISAで測定した抗dsDNA IgGの力価との間の相関関係を示す。

【0032】

【図20】WT Mockを導入したマウス（4匹）、1.5kb.UCOE.BTKpを導入したマウス

50

(4匹)およびE μ .BTKpを導入したマウス(8匹)から得た血清を自己抗原アレイで分析し、88種のマウス抗原に対して反応性を示すIgMおよびIgGのレベルを調べたことを示す。各行のデータをZスコアに変換した。Zスコアでは、最も低い反応性(赤色)から最も高い反応性(青色)までが比色定量スケールで示される。

【0033】

【図21】B細胞の発生とBTK酵素が関与する経路を示す。

【0034】

【図22】遺伝子療法用の最適なBTKレンチウイルスベクターの開発を示す。

【0035】

【図23】内在性BTKプロモーターを含むレンチウイルスベクターを示す。図に示すように、A2プロモーターが削除され、2kb CBX3-HNRPA2B1エレメント(1.5kbのUCOE)が挿入されているが、CBX3は逆方向で保持されている。

10

【0036】

【図24】内在性BTKプロモーターを含むレンチウイルスベクターの作製を示す。図に示すように、B細胞においてBtkのMFIが高くなることはE μ と関連性がある。

【0037】

【図25】内在性BTKプロモーターを含むレンチウイルスベクターのFACSアッセイの結果を示す。

【0038】

【図26】ベクターで処置したマウスの脾細胞から得た骨髄系細胞におけるBTKの発現を示す。

20

【0039】

【図27】B細胞特異的プロモーターであるE μ .B29を含むBTK発現レンチウイルスを導入したB細胞におけるBTKの発現を測定した結果を示す。

【0040】

【図28】プロモーター領域としてBTKpro.BTKを含むレンチウイルスベクターから発現させた、B細胞および単球におけるBTKの発現を示す。

【0041】

【図29】プロモーター領域としてのBTKpro.BTKと遍在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)を含むレンチウイルスベクターから発現させた、B細胞および単球におけるBTKの発現を示す。

30

【0042】

【図30】プロモーター領域としてのE μ .BTKpro.BTK(BTKプロモーター)とhuBTKを含むレンチウイルスベクターから発現させた、B細胞および単球におけるBTKの発現を示す。

【0043】

【図31】骨髄、脾臓および腹腔から得たB細胞および骨髄系細胞における、いくつかの種類のBTKプロモーターによるBTK発現プロファイルを示す。

【0044】

【図32】骨髄、脾臓および腹腔から得たB細胞および骨髄系細胞における、いくつかの種類のBTKプロモーターによるBTK発現プロファイルを示す。使用したベクターは、WT Mock、DKO Mock、BTKp、UCOE BTKp、UCOE.BTKp.coおよびE μ BTKpであった。

40

【0045】

【図33】各成熟B細胞サブセットにおけるB細胞の発生の回復を示す。黒色の領域は、より成熟度の高い末梢B細胞集団を示す。

【0046】

【図34】各B細胞集団(骨髄、脾臓および腹腔)において再構成されて発生したB細胞の数を示す。1種類のベクターにつき最大で40匹のレシピエントマウスと、同様の数のコントロールから得た知見をまとめたデータを示す。

【0047】

50

【図35】4種のレンチウイルスベクター（Mock WT、DKO Mock、UCOE.BTKp含有レンチウイルスベクターおよびE μ .BTKpレンチウイルスベクター）のいずれかを発現した細胞におけるB細胞の増殖を示す。生細胞染色色素の希釈に対してBtk染色をプロットしたところ、UCOEを使用した実験では、WTマウスと非常に類似した結果が得られることが示された。

【0048】

【図36】WTベクター、WT Mockベクター、DKOベクター、DKO Mockベクター、UCOE.BTKpベクターまたはE μ .BTKpベクターで形質導入した細胞におけるB細胞の増殖を示す。

【0049】

【図37】WTベクター、WT Mockベクター、DKOベクター、DKO Mockベクター、BTKpベクター、UCOE.BTKpベクターまたはE μ .BTKpベクターで形質導入した細胞におけるIgMおよびIgGの産生を測定した結果を示す。下のパネルは、WTベクター、WT Mockベクター、DKOベクター、DKO Mockベクター、UCOE.BTKpベクター、WT-0ベクターまたはKO-0で形質導入した細胞におけるT非依存性免疫応答を示す。ここでも、E μ プロモーターを使用した場合のIgG量が、WT MockレシピエントにおけるIgG量をわずかに上回ったことには注目されたい。

【0050】

【図38】WTベクター、WT Mockベクター、DKOベクター、DKO Mockベクター、BTKpベクター、UCOE.BTKpベクター、UCOE.BTKp.coベクター、WT-0ベクター、E μ .BTKpベクターまたはKO-0ベクターで形質導入した細胞におけるT依存性免疫応答を示す。

【0051】

【図39】T依存性免疫化後の親和性成熟を示す。UCOEを形質導入したマウスおよびコントロールにおける親和性成熟は非常によく似ていた。

【0052】

【図40】自己抗体が産生された証拠を示す。

【0053】

【図41】WT Mockベクター、UCOE.BTKpベクターまたはE μ .BTKpベクターを含む各細胞のヒートマップにより、自己抗体が産生された証拠を示す。この実験は、IgMおよびIgGの産生を調べるために実施した。

【0054】

【図42】BTKを発現したマウスの生存率（%）と抗体量の関連性を示す。

【0055】

【図43】二次レシピエントマウスにおいて、BTKを発現した好中球における長期的な幹細胞マーカーの発現を示す。

【0056】

【図44】Mockベクター、BTKpベクター、UCOE.BTKpベクター、UCOE.BTKp.coベクターまたはE μ .BTKpベクターを導入した一次レシピエントおよび二次レシピエントにおけるウイルスコピー数あたりの長期的な幹細胞マーカーの発現を示す。

【0057】

【図45】長期生存率に対するレンチウイルス療法の影響を示す。

【0058】

【図46】BTKプロモーターを含むレンチウイルスにおいて別のエンハンサーエレメントを使用した試験の概要を示す。

【0059】

【図47】0.7UCOE.BTKpおよび0.7UCOE.IE.BTKpがBTKの発現と脾臓B細胞の数を回復することを示す。

【0060】

【図48】0.7UCOE.BTKpおよび0.7UCOE.IE.BTKpがB細胞の機能を回復することを示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 1 】

【 図 4 9 】 0.7UCOE.IEの安全性プロファイルが0.7UCOEよりも改善していることを示す。

【 0 0 6 2 】

【 図 5 0 】 DNase高感受性領域を含む新たなBTK構築物を示す。

【 0 0 6 3 】

【 図 5 1 】 DNase高感受性領域の同定を示す。

【 0 0 6 4 】

【 図 5 2 】 細胞においてBTKの発現を評価した構築物の模式図を示す。

【 0 0 6 5 】

【 図 5 3 】 DNase高感受性領域 (DHS) を含む構築物と0.7UCOEおよび0.7UCOE.IEとのインピボでの比較を示す。

【 0 0 6 6 】

【 図 5 4 】 移植の15週間後の末梢血リンパ球分布において、B細胞、T細胞、単球および好中球が占める割合を示す。また、放射線非照射KOベクター、KO Mockベクター、0.7UCOEベクター、0.7UCOE.IEベクター、0.7UCOE.DHS4ベクター、0.7UCOE.DHS12ベクター、0.7UCOE.DHS124ベクター、0.7UCOE1-5ベクター、WT Mockベクターおよび放射線非照射WTベクターの各ベクターを導入した細胞におけるリンパ球サブセットにおいてBTKの再構成が示された。

【 0 0 6 7 】

【 図 5 5 】 KO Mockベクター、0.7UCOEベクター、0.7UCOE.IEベクター、0.7UCOE.DHS4ベクター、0.7UCOE.DHS12ベクター、0.7UCOE.DHS124ベクター、0.7UCOE1-5ベクターおよびWT Mockベクターを導入した細胞におけるBTK実験の要約を示す。

【 0 0 6 8 】

【 図 5 6 】 UCOEエレメントまたはDHS4エレメントを含むベクターを導入した細胞におけるBTKの発現を示す。

【 0 0 6 9 】

【 図 5 7 】 0.7UCOE.BTKp.coBTKベクター、KO Mockベクター、0.7UCOEベクター、DHS4ベクター、DHS1-5ベクターまたはWT Mockベクターを導入した細胞におけるBTK発現実験を示す。

【 0 0 7 0 】

【 図 5 8 】 KO Mockベクター、WT Mockベクター、0.7UCOEベクター、DHS4ベクターまたはDHS1-5ベクターを導入した細胞を移植してから12週間後における末梢血リンパ球の分布を示す。

【 0 0 7 1 】

【 図 5 9 】 放射線非照射KOベクター、KO Mockベクター、0.7UCOEベクター、DHS4ベクター、DHS1-5ベクター、WT Mockベクターまたは放射線非照射WTベクターを導入した6週間後および12週間後の末梢血リンパ球分布において、B細胞、単球および好中球が占める割合を示す。

【 0 0 7 2 】

【 図 6 0 】 放射線非照射KOベクター、KO Mockベクター、0.7UCOEベクター、DHS4ベクター、DHS1-5ベクター、WT Mockベクターまたは放射線非照射WTベクターを導入した6週間後および12週間後のB細胞、単球および好中球におけるBTKの発現を示す。

【 0 0 7 3 】

【 図 6 1 】 細胞を移植してから12週間後に採取した血液中の各細胞サブセットにおいてBTKが発現されていることを示す。

【 0 0 7 4 】

【 図 6 2 】 当初のcoBTK (コドン最適化されたBTK) と新たなcoBTKをインピトロで比較するための実験セットアップを示す。

【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

50

【図63】TBK系統から得た陰性細胞に、同じ量にそろえたウイルスを添加したインビトロでの比較（7日目にBTK染色）を示す。

【0076】

【図64】BTK発現用のレンチウイルスベクターを様々な濃度で導入した細胞におけるBTK発現の割合（%）を示す。使用したベクターは、KO Mockベクター、0.7UCOEベクター、DHS4ベクター、0.7UCOE.newcoBTKベクター、0.7UCOE.newcoBTKベクターおよびWT脾臓ベクターであった。

【0077】

【図65】当初のcoBTKと新たなcoBTKのインビボでの比較を示す。

【0078】

【図66】UCOEエレメントを最適化してBTKの発現を増加または増強するための別の手法を示す。

【0079】

【図67】前記1.5kbのUCOEエレメントを最適化してBTKの発現を増加または増強するための別の手法を示す。

【0080】

【図68】ウイルス液量をそろえたインビトロ試験における0.7UCOE.BTKpと0.7UCOE.fwd.BTKpの比較を示す。

【0081】

【図69】臨床用のBTK LV構築物の完成までのアウトラインを示す。

【0082】

【図70】臨床用のBTK LV構築物の完成までのアウトラインと、コドン最適化したBTKの最終的なインビボ試験の計画を示す。

【0083】

【図71】アフレーシス療法が承認されたXLA患者の幹細胞を示す表である。

【0084】

【図72】NSGマウスにおけるヒトキメラを示す。

【0085】

【図73】骨髄および脾臓のB細胞におけるヒトリンパ球の再構成を示す。

【0086】

【図74】移植されたXLA罹患幹細胞の（脾臓における）表現型（IgDやIgMの発現など）を示す。

【0087】

【図75】移植されたXLA罹患幹細胞の（脾臓における）表現型（CD24やCD38の発現など）を示す。

【0088】

【図76】B細胞の発生停止（骨髄）を示し、XLA群と健常群の間でプロB細胞の割合（%）が等しいことを示す。

【0089】

【図77】B細胞の発生停止（骨髄）を示し、XLA患者は健常コントロールよりもプレB細胞の割合（%）が有意に高いことを示す。

【0090】

【図78】B細胞の発生停止（骨髄）を示し、XLA患者では、プレB細胞期で分化が停止することを示す。プレB細胞は脾臓に遊走することができる。CD179 /CD179 代替軽鎖は、シグナル伝達因子であるCD79 /CD79 ヘテロダイマーとも会合して、膜結合型Igμ重鎖にジスルフィド結合し、いわゆるプレB細胞受容体（preBCR）と呼ばれるB細胞受容体様構造を形成する。

【0091】

【図79】B細胞の発生停止（骨髄）を示す。XLAに罹患したB細胞の発生は、プレB細胞期で停止する。プレB細胞は脾臓に遊走することができる。

10

20

30

40

50

【0092】

【図80】Ca²⁺の流入によってB細胞が機能することを示す。しかしながら、XLAに罹患したB細胞では、IgMが発現しているため、コントロール細胞と比較してCa²⁺を流入させることができない。

【0093】

【図81】B細胞発生経路の停止を示す。XLAの影響により、B細胞の発生がプレB細胞期で停止する。

【0094】

【図82】実験の結果と結論の概要を示す。

【0095】

【図83】レンチウイルスによるヒト幹細胞への形質導入の概要を示した図を示す。

【0096】

【図84】ヒト造血幹細胞(HSC)を用いた前臨床モデルの構築の概要を示した図を示す。

【0097】

【図85】レンチウイルスによりヒト幹細胞に形質導入した結果を示す。図に示すように、0.7UCOE.BTKp.BTKでは、DHS4と比べて生存率が70%となった。

【0098】

【図86】XLA P2患者における15日目のBTKの発現を示す。図に示すように、非選択環境下において、0.7UCOE.BTKpBTKは、DHS4と比べてBTKの発現が高くなる。

【0099】

【図87】本実験と追跡実験の結論の概要を示す。

【0100】

【図88】ヒト造血幹細胞(HSC)の前臨床モデルの構築を示す。この実験では、MockベクターまたはUCOE.BTKp.coベクターを使用してCD34+細胞に形質導入する。

【0101】

【図89】ヒト造血幹細胞(HSC)の前臨床モデルの構築を示す。UCOE.BTKpro.co-op BTK(UCOE.BTKp.co) GFPベクターを使用して細胞に形質導入した。

【0102】

【図90】NSGレシピエントマウスに形質導入するための実験方法を示した図を示す。

【0103】

【図91】形質転換したレシピエントマウスから得た結果を示す。具体的には、GFPの発現量(%）、骨髄細胞および脾細胞において発現したウイルスのコピー数、ならびにB細胞および骨髄系細胞における発現を示す。

【0104】

【図92】マウスとヒトのBTK遺伝子配列を比較することによって、保存された非コード配列を同定した分析結果と、BTKの発現について試験したすべてのベクターを示す。保存された非コード配列は、BTKプロモーターの内部、BTKプロモーターの上流かつ隣接遺伝子(BTKエンハンサーすなわちBTKe)の近傍、イントロン1内の一部、イントロン4の内部、イントロン5の内部およびイントロン13の内部に同定され、その位置が特定された。

【0105】

【図93】1.5kbのUCOEの末端を切断して0.7kbとし、DNAエンハンサーエレメントとして機能しうる領域を特定することによって、レンチウイルス構築物の力価とBTKの発現を向上できる可能性があることを検討した結果を示す。(a)1.5kbの偏在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)の末端を切断して0.7kbとした結果を示す。UCOEエレメントは、ハウスキーピング遺伝子CBX3とハウスキーピング遺伝子HNRPA2B1が互いに外側に転写されるプロモーター領域にまたがる大きなCpGリッチ領域に存在し、タンパク質発現構築物において使用するために、従来から様々な研究グループによって1.5~2.2kbの長さの領域になるように末端切断が行われている。本実験で使用する1.5kbのUCOEは、CBX3のエキソン1からCBX3の選択的エキソン1を超えて伸びている。この領域を0.7

10

20

30

40

50

kbのサイズになるように末端切断すると、選択的エキソン1の下流の領域が除去される。
 (b) ENCODEデータベースを利用して、BTK遺伝子のイントロン領域からDNase I高感受性領域(DHS)を同定し、UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assemblyを使用して視覚化した。5つのDHSを同定し、DHS1、DHS2、DHS3、DHS4およびDHS5として順に示した(青色の四角)。ENCODEを利用したゲノムセグメンテーションによって、DHS4の周辺に、予測されたエンハンサーエレメントが同定された(黄色の四角)。エキソンは黒色の四角で示す。配列の長さは、各DHSの下に記載する。これらのDHS配列を様々に組み合わせて0.7UCOE.BTKp.coBTK構築物にクローニングし、インビトロで試験した(データ示さず)。(c) インビトロにおいてマウス(TBK)系統由来の陰性細胞への形質導入実験を実施し、2種のコドン最適化BTKによるBTKの発現量を比較した。この2種のコドン最適化BTKとして、coBTK(図1~2)と、Staalら(Leukemia 2010)によって報告されているコドン最適化BTK(本明細書においてco2BTKと呼ぶ)を使用した。形質導入の7日後のBTKの発現を代表的なフローサイトメトリープロットに示す。(d) DHS構築物についてインビトロ試験を行った結果およびcoBTKとco2BTKを比較した結果に基づいて、インビボ試験に使用する4種の構築物を特定した。図に示すように、これらの構築物はRRLバックボーンを有するレンチウイルス構築物であり、いずれかの種類のコドン最適化ヒトBTK(coBTKまたはco2BTK)を発現し、0.7kbの遍在性クロマチンオープニングエレメント(0.7UCOE)を含み、その下流にDHS4が付加されているか、付加されていないものであった。

【0106】

【図94】0.7UCOEベクターを使用した遺伝子療法で処置したマウスにおける、罹患した造血細胞系列でのBTK発現の回復と、B細胞の発生を示す。移植の19~23週間後における、BTK+細胞の割合と、再構成された各B細胞サブセットの細胞数および各骨髄系細胞サブセットの細胞数を評価した。(図94A)エンドポイント分析での脾臓B細胞における細胞内BTK染色を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。(b~d)遺伝子療法で処置した群から得た骨髄(図94B)、脾臓(図94C)および腹腔(図94D)中の各リンパ球サブセットにおけるBTK+細胞の割合(%)をフローサイトメトリーで測定した。各細胞サブセットを、好中球(CD11b+GR1+)、単球(CD11b+)およびB細胞(B220+)として定義する。(図94E~F)骨髄(図94E)、脾臓(図94F)および腹腔(図94G)における各B細胞サブセットの平均細胞数を積み上げ棒グラフに示す。早期B細胞の発生(骨髄)、すなわち、プロB細胞+プレB細胞(IgM-, IgD-)、未熟B細胞(IgM+IgD-)および成熟B細胞(IgM+, IgD+)を示す。後期B細胞の発生(脾臓)、すなわち、1型移行期(T1)B細胞(CD24hi, CD21-)、2型移行期(T2)B細胞(CD24hi, CD21int)、辺縁帯/辺縁帯前駆(MZ/MZP)B細胞(CD24hi, CD21hi)および濾胞成熟(FM)B細胞(CD24int, CD21int)を示す。腹腔内B細胞サブセット、すなわち、B1細胞(IgM+CD43+)およびB2細胞(CD43-)を示す。(図94H)フローサイトメトリーで測定した各B細胞サブセットにおけるBTKの発現の回復を示す。(図94I)各実験において、WT Mockで正規化したB細胞の発生過程におけるBTK+のMFIを示す。データは、4回の独立した実験の平均値±SDを示し、n=13(WT Mock)、n=13(KO Mock)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co2)、n=16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)およびn=6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)とした。P値は、Sidak法を使用した一元配置分散分析により算出した(***P 0.001; **P=0.001~0.01; *P=0.01~0.05)。

【0107】

【図95】インビボおよびインビトロにおけるB細胞の機能の回復を示す。(図95A)移植の12週間後に、アラム(Alum)を加えたNP-CGGでマウスを免疫化した。免疫化したマウスの血清中のNP特異的IgG濃度をELISAで測定し、IgG標準品に対する相対量として示した。免疫前(-)および一次免疫の10日後(1⁰)に、高親和性NP特異的IgGの血清中濃度を測定した。初回免疫の1ヶ月後に、PBSに加えたNP-CGGをマウスに再投与し、10日後に血清を採取した(2⁰)。(図95B~C)エンドポイント分析(移植の21

10

20

30

40

50

～23週間後)において、各ベクターで処置したマウスの血清中の総IgG濃度(図95B)および総IgM濃度(図95C)をELISAで測定した。(図95D～F)エンドポイント分析において、CD43-細胞を磁気分離することによって脾細胞からB細胞を単離し、Cell Trace Violetで標識し、インビトロにおいてIgM、LPSまたは培地コントロールで刺激した。(図95D)抗マウスIgM抗体、LPSまたは培地のみを加えて72時間インキュベーション後に1回以上細胞分裂したBTK+B細胞の割合(%)を示す(フローサイトメトリーにより解析した)。(図95E)WT Mockで正規化した、各細胞分裂(D0～D4)後の細胞におけるBTK+のMFIを示す。(図95F)IgMで刺激した72時間後のB細胞におけるCell Trace試薬の希釈に対してBTK染色をプロットし、生細胞とB220+BTK+細胞でゲーティングした代表的なフローサイトメトリープロットである。データは、4回の独立した実験の平均値±SDを示し、n=13(WT Mock)、n=13(KO Mock)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co2)、n=16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)およびn=6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)とした。P値は、Sidak法を使用した一元配置分散分析により算出した(***P 0.001; **P=0.001～0.01; *P=0.01～0.05)。

10

【0108】

【図96】ベクターの安全性に関する考察を示す。(図96A～B)各ベクターで処置したマウスの血清中の抗dsDNA IgG濃度(図96A)および抗dsDNA IgG2c濃度(図96B)をELISAで測定し、吸光度の測定値(OD450)として示した。ポジティブコントロールとして、自己免疫疾患傾向のある公知のWASキメラマウスモデルから得た血清、およびEμ.BTKpで処置したマウスから得た血清を使用した。(図96C)エンドポイント分析において、全骨髄細胞および全脾細胞からゲノムDNAを単離し、細胞1個あたりのウイルスの組み込み数(ウイルスコピー数)をqPCRで定量した。データは、4回の独立した実験の平均値±SDを示し、n=13(WT Mock)、n=13(KO Mock)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co2)、n=16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)およびn=6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)とした。P値は、Sidak法を使用した一元配置分散分析により算出した(***P 0.001; **P=0.001～0.01; *P=0.01～0.05)。

20

【0109】

【図97】トランスフェクションプロトコルの模式図を示す。

30

【0110】

【図98】複数の処置群間で条件を同じにしてヒト造血細胞を骨髄に移植した結果を示す。遺伝子療法を行ったXLA患者由来ヒト幹細胞、または遺伝子療法を行っていないXLA患者由来ヒト幹細胞を、健常ドナー由来のヒト幹細胞と条件を同じにして骨髄に移植した。(図98A)ヒトおよびマウスのCD45(造血細胞マーカー)、CD33(骨髄系細胞)およびCD19(B細胞)、ならびにCD4およびCD8(T細胞)を含む、ヒト免疫細胞の様々なマーカーを示した代表的なフローサイトメトリープロットである。生きた全骨髄細胞をhCD45+およびmCD45-でゲーティングしてヒト造血細胞分画を得た後、hCD45+でゲーティングした細胞集団においてCD33マーカーおよびCD19マーカーを分析し、さらに、CD33-CD19-でゲーティングした細胞集団においてCD4およびCD8を分析した。(図98Bおよび図98C)骨髄に移植したヒトCD45細胞の割合(%)およびhCD45細胞の総数を示す。各コホート(XLA3、XLA3+0.7UCOE.BTKp.BTKco2レンチウイルス、XLA3+0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2レンチウイルスおよび健常ドナー)につきn=4とした。

40

【0111】

【図99】XLA患者3の細胞を使用した前臨床モデルの構築を示す。移植の12週間後に脾臓を分析した結果を示す。

【0112】

【図100】XLA患者3の細胞を使用した前臨床モデルの構築を示す。0.7UCOE.BTKp.BTKco2または0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2を使用した遺伝子療法でXLA患者3由来のHSCを処置し、このHSCをマウスレシピエントに投与してから12週間後に脾臓を分析し

50

た結果を示す。

【0113】

【図101】B細胞の発生過程で見られる各サブセットを脾臓において調べた代表的なフローサイトメトリープロットを示す。各遺伝子療法コホートにおいて、ヒトB細胞の発生過程で見られる各サブセットを特定するための典型的なゲーティング方法を示す（右側に示す）。各パネルにおいて使用したマーカーを下に示す（Hist = ヒストグラム）。あらかじめゲーティングを行った場合は、各列の上方に示す。

【0114】

【図102】XLA患者3由来のHSCをレンチウイルス（0.7UCOE.BTKp.BTKco2または0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTKco2を使用）で形質導入し、レシピエントに移植すると、XLAコントロールと比べて、脾臓中の未熟B細胞（CD19+CD24+CD38+B細胞およびCD19+CD24+CD38+IgM+細胞を含む）の割合が増加することを示す。図4に示したフローサイトメトリーの結果を、特定の未熟B細胞の亜集団別にまとめたグラフを示す。A：脾臓における未熟B細胞（CD24+CD38+）の割合（%）を示す。B：IgM+未熟B細胞の割合（%）を示す。C～D：脾臓における未熟B細胞（CD24+CD38+）の総数およびCD24+hCD38+IgM+細胞の総数を示す。E：CD10のヒストグラムの重ね合わせを示し、健常ドナーと比べてCD10の平均蛍光強度（MFI）の変化を示す。各コホートにつきn=4とし、***P=0.0004；**P=0.0044；*P=0.4（一元配置分散分析）とした。

10

【0115】

【図103】XLA患者由来のHSCをレンチウイルス（0.7UCOE.BTKp.BTKco2または0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTKco2）で形質導入し、レシピエントに移植すると、XLAコントロールと比べて、成熟B細胞（CD19+CD24^{low}CD38^{low}IgM+IgD⁺）の割合が増加することを示す。（図104A～C）脾臓における成熟B細胞（hCD24^{low}hCD38^{low}）の割合（%）とIgM+成熟B細胞およびIgM+IgD+成熟B細胞の割合（%）を示す。（図103D～F）脾臓成熟B細胞、IgM+成熟B細胞およびIgM+IgD+成熟B細胞の総数を示す。（図103G）CD10のヒストグラムの重ね合わせであり、CD10のMFIが健常ドナーと似ていることを示す。各コホートにつきN=4とし、***P=0.0004；**P=0.0044；*P=0.4（一元配置分散分析）とした。

20

【0116】

【図104】B細胞の発生過程で見られる各サブセットを骨髄において調べた代表的なフローサイトメトリープロットを示す。

30

【0117】

【図105】XLA患者由来のHSCをレンチウイルス（0.7UCOE BTKp BTKco2またはDHS4 BTKpBTK.co2を使用）で形質導入し、レシピエントに移植すると、XLAコントロールと比べて、CD19+CD24+CD38+IgM+未熟B細胞の割合が増加することを示す。

【0118】

【図106】XLA患者由来のHSCをレンチウイルス（0.7UCOE BTKp BTKco2を含むレンチウイルスまたは0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTK.co2を含むレンチウイルスを使用）で形質導入し、レシピエントに移植すると、インビボにおいて細胞1個あたり0.2～2のウイルスコピー数（VCN）で遺伝子が組み込まれることを示す。

40

【0119】

【図107】0.7UCOE.BTKp.BTKco2を含むレンチウイルスまたは0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2を含むレンチウイルスを使用した遺伝子療法でXLA患者3由来のHSCを処置し、このHSCをレシピエントに移植すると、インビボにおいてIgM分泌B細胞が産生されることを示す。

【0120】

【図108】0.7UCOE.BTKp.BTKco2を含むレンチウイルスまたは0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2を含むレンチウイルスでXLA患者3由来のHSCを形質導入し、このHSCをレシピエントに移植すると、B細胞受容体（BCR）の結合に応答したB細胞によるカルシウム流入が回復することを示す。

50

【 0 1 2 1 】

【 図 1 0 9 】 B 細胞分化誘導プロトコルを示す。

【 0 1 2 2 】

【 図 1 1 0 】 インビトロにおける B 細胞クラススイッチを示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。

【 0 1 2 3 】

【 図 1 1 1 】 XLA 患者由来の HSC をレンチウイルス (0.7UCOE BTKp BTKco2 または DH S4 BTKpBTK.co2 を使用) で形質導入し、レシピエントに移植すると、サイトカインおよび T 細胞依存性シグナルに応答可能な B 細胞が産生され、抗体が分泌されることを示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 1 2 4 】

用語の定義

別段の記載がない限り、本明細書で使用されている技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。

【 0 1 2 5 】

本明細書において「 a 」または「 an 」は、 1 つまたは 1 つ以上を意味してもよい。

【 0 1 2 6 】

本明細書において「 約 」は、測定値について述べる場合、所定値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ の変動を含むことを意味し、より好ましくは $\pm 5\%$ の変動、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ の変動、さらにより好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を含むことを意味する。

【 0 1 2 7 】

本明細書で述べる「ポリヌクレオチド」は、「核酸」または「核酸分子」を指し、たとえば、デオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA)、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により得られる断片、ライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用およびエキソヌクレアーゼ作用のいずれかにより得られる断片などが挙げられる。核酸分子は、天然のヌクレオチドモノマー (DNA、RNA など)、または天然のヌクレオチドの類似体 (たとえば、天然のヌクレオチドのエナンチオマー) からなるモノマー、またはこれらの組み合わせから構成されていてもよい。修飾ヌクレオチドは、糖部分および/またはピリミジン塩基部分もしくはプリン塩基部分に修飾を有していてもよい。糖部分の修飾としては、たとえば、ハロゲン、アルキル基、アミンまたはアジド基による 1 つ以上のヒドロキシル基の置換が挙げられ、糖部分はエーテル化またはエステル化されていてもよい。さらに、糖部分全体が、立体構造的に類似の構造や電子的に類似の構造と置換されていてもよく、このような構造として、たとえば、アザ糖および炭素環式糖類似体が挙げられる。修飾塩基部分としては、アルキル化プリン、アルキル化ピリミジン、アシル化プリン、アシル化ピリミジン、およびその他の公知の複素環置換基が挙げられる。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはこれと似た結合により連結することができる。ホスホジエステル結合と似た結合としては、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホロセレノエート結合、ホスホロジセレノエート結合、ホスホロアニリドエート (phosphoroanilothioate) 結合、ホスホロアニリデート (phosphoranilidate) 結合、ホスホロアミデート結合などが挙げられる。「核酸分子」は、いわゆる「ペプチド核酸」も包含し、これは、ポリアミド主鎖に付加された天然の核酸塩基または修飾核酸塩基を含む。核酸は、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。いくつかの実施形態において、融合タンパク質をコードする核酸配列を提供する。いくつかの実施形態において、前記核酸は RNA または DNA である。

【 0 1 2 8 】

「コードする」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、遺伝子、cDNA、mRNA などのポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列が、所定のアミノ酸配列などの別の巨大分子を合成するための鋳型として機能するという特性が挙げられるが、これに限定されない。このように、特定の遺伝子に対応する mRNA が転写および翻訳されて、細胞またはその他の生物系においてタンパク質が産生された

10

20

30

40

50

場合、その遺伝子はこのタンパク質をコードすると言える。

【0129】

「ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK)」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、ヒトではBTK遺伝子によってコードされる酵素が挙げられるが、これに限定されない。BTKは、B細胞の発生に重要な役割を果たすキナーゼである。たとえば、BTKは、B細胞の成熟に重要な役割を果たしており、さらに、高親和性のIgE受容体を介した肥満細胞の活性化にも重要な役割を果たしている。BTK遺伝子の変異は、原発性免疫不全疾患であるX連鎖無グロブリン血症 (ブルトン型無グロブリン血症) (XLAと略されることもある) に関与している。XLAに罹患した患者の骨髄中のプレB細胞集団は正常であるが、これらのプレB細胞は成熟できず、循環系に入ることもできない。

10

【0130】

本明細書で述べる「X連鎖無グロブリン血症 (XLA)」は、感染症と戦う生体能力が影響を受ける遺伝子疾患である。無グロブリン血症はX連鎖性であるため、男性に発症することが多い。XLAに罹患した人では、白血球の形成過程において成熟B細胞が発生せず、これによって、血流中のグロブリンと呼ばれるタンパク質 (抗体など) が完全に、またはほぼ完全に欠損している。X連鎖無グロブリン血症 (XLA) は、2歳までの罹患男児において再発性の細菌感染症が見られることを特徴とする。診断前に最も一般的に見られる感染症は再発性耳炎である。結膜炎、副鼻腔肺感染症、下痢および皮膚感染症も頻繁に見られる。生命を脅かすような重度の感染症 (肺炎、蓄膿症、髄膜炎、敗血症、蜂巣炎、敗血症性関節炎など) を発症している場合、免疫不全を有していると認識され、免疫不全を有するXLA患者は約60%に達する。

20

【0131】

「プロモーター」は、特定の遺伝子の転写を開始させるDNA領域である。プロモーターは、遺伝子転写開始部位の近傍に位置していてもよく、同じDNA鎖内の上流 (センス鎖の5'領域) に位置していてもよい。プロモーターは、条件誘導型プロモーターであってもよく、構成的プロモーターであってもよい。プロモーターは、細菌細胞におけるタンパク質発現に特異的であってもよく、哺乳動物細胞におけるタンパク質発現に特異的であってもよく、昆虫細胞におけるタンパク質発現に特異的であってもよい。いくつかの実施形態において、融合タンパク質をコードする核酸が提供される場合、該核酸はプロモーター配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、哺乳動物におけるタンパク質発現に特異的である。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、条件誘導型プロモーターまたは構成的プロモーターである。

30

【0132】

本明細書で述べる「遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE)」は、普遍的に発現されるハウスキーピング遺伝子のプロモーター含有CpGアイランドに由来する制御因子である。このようなプロモーターに由来する制御因子は、クロマチンリモデリング機能を持つため、許容される構造内でクロマチンを維持し、近傍の遺伝子を一貫して高発現させることが提案されている。UCOEは、本来、比較的大きな因子 (最大で16kb) であるが、これよりも小さい新たな合成UCOEを使用することによって、導入遺伝子を高発現させることができると考えられる。遍在性クロマチンエレメントおよびその機能を図1に示す。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に示される配列を含む。

40

【0133】

「コドン最適化」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、特定のコドンを、タンパク質の発現効率を最大限まで上昇させることが知られている別のコドンに変更する設計プロセスが挙げられるが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、ヒトにおける発現用にコドン最適化することが好ましく、このコドン最適化は、当業者に公知のアルゴリズムを使用して、ヒトにおいて高収率でmRNAお

50

よびタンパク質を産生できるように最適化した合成遺伝子転写物を作製することによって実施することができる。ヒトのコドンを最適化するためのアルゴリズムを含んだプログラムは容易に入手可能である。このようなプログラムとして、たとえば、OptimumGene™ アルゴリズムやGeneGPS（登録商標）アルゴリズムなどが挙げられる。さらに、コドンが最適化されたヒト配列は、たとえば、Integrated DNA Technologies社から市販品として入手できる。

【0134】

最適化することによって、ポリヌクレオチドの二次構造の形成を低下させることもできる。本発明の方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ベクターに含まれる前記配列を最適化することによって、総GC/A T比を低下させることもできる。コドンの最適化を厳密に行うと、望ましくない二次構造が形成されたり、あるいは高GC含量となって二次構造が形成されるという望ましくない結果となる場合がある。二次構造はそれ自体が転写効率に影響を与える。コドン使用の最適化を行った後にGeneOptimizerなどのプログラムを使用することによって、二次構造の形成を回避したり、GC含量を最適化したりすることができる。このようなさらなるプログラムは、最初のコドン最適化を行った後にさらに最適化を実施したり、トラブルシューティングを行うために使用することができ、それによって、1回目の最適化の後で起こりうる二次構造の形成を制限することができる。最適化用の別のプログラムも容易に入手可能である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ベクターは、二次構造の形成を回避できるように最適化された配列、および/または総GC/A T比が低下するように最適化された配列、および/またはヒトにおける発現用に最適化された配列を含む。いくつかの本発明の実施形態において、BTKをコードする前記遺伝子はコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、コドン最適化されたBTKは、配列番号6または配列番号7に示される配列を含む。

【0135】

本明細書で述べる「エンハンサーエレメント」は、タンパク質（アクチベーター）が結合することができる短いDNA領域であり、アクチベーターがエンハンサーエレメントに結合することによって特定の遺伝子の転写が起こる可能性を高めることができる。アクチベーターは、転写因子とも呼ばれる。エンハンサーは、シス作用性であってもよく、トランス作用性（遺伝子から離れた位置で作用する）であってもよく、標的遺伝子から最大で1Mbp（1,000,000bp）離れて存在していてもよく、転写開始部位の上流または下流に存在していてもよく、順方向または逆方向のいずれであってもよい。エンハンサーのサイズは、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000bp、1100bp、1200bp、1300bp、1400bpもしくは1500bpであってもよく、またはこれらの数値のいずれか2つによって定義される範囲内の長さ（bp）であってもよい。

【0136】

本明細書で述べる「DNase I高感受性領域」は、DNase I酵素によって切断されやすいクロマチン領域である。ゲノム内のこの特定の領域では、凝集したクロマチン構造は失われており、DNAが露出することによって、DNAへのアクセスが容易となっている。この結果、DNase Iなどの酵素によりDNAを分解することが可能となる。このようなクロマチンのリモデリングは、転写因子などのタンパク質の結合に必要とされることから、前述のアクセス可能なクロマチン領域は、転写活性と機能的に関連している。本発明の実施形態では、「Dnase I高感受性領域4」（DHS4）について述べている。DHS4は、グロビンプロモーターから-18kbの位置にあるエンハンサーであり、赤血球特異的タンパク質に対する結合部位と遍在性タンパク質に対する結合部位を含んでいてもよく、制御因子として重要な役割を果たしている。本発明の実施形態のいくつかにおいて、前記BTK発現用ベクターは、少なくとも1つのDNase高感受性領域（DHS）を含む。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、DNase高感受性領域1（DHS1）、DNase高感受性領域2（DHS2）、DNase高感受性領域3（DHS3）、DNase高感受性領域4（DHS4）および/またはDNase高感受性領域5（DHS5）である。

10

20

30

40

50

【0137】

本明細書で述べる「イントロン」は、遺伝子における最終的なRNA産物の成熟過程でRNAスプライシングによって除去されるあらゆるヌクレオチド配列を指す。本発明のベクターの実施形態のいくつかにおいて、該ベクターは、少なくとも1つのイントロン領域を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座に由来するものである。

【0138】

「ベクター」、「発現ベクター」または「構築物」は、細胞に異種核酸を導入するために使用される核酸であり、様々な制御因子を含むことから、細胞において異種核酸を発現させることができる。ベクターとしては、プラスミド、ミニサークル(minicircle)、酵母、およびウイルスゲノムが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

10

【0139】

本明細書で述べる「B細胞」は、リンパ球サブタイプに属する白血球の一種である。B細胞は、Bリンパ球としても知られている。B細胞は、抗体を分泌することにより、獲得免疫系における液性免疫の構成成分として機能することができる。さらに、B細胞は抗原を提示し(B細胞は、専門の抗原提示細胞(APC)としても分類される)、サイトカインを分泌する。本明細書で提供される細胞の実施形態のいくつかにおいて、該細胞はB細胞である。

20

【0140】

「骨髄系細胞」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、骨髄または脊髄に見られる顆粒球前駆細胞または単球前駆細胞や、骨髄または脊髄に見られるこれらと類似した細胞が挙げられるが、これらに限定されない。骨髄系細胞系列には、末梢血中を循環する単球、およびこれらの単球から成熟、分化および/または活性化した細胞集団が含まれる。このような細胞集団には、終末分化していない骨髄系細胞、骨髄由来免疫抑制細胞、および分化したマクロファージが含まれる。分化したマクロファージには、分極化していないマクロファージ、分極化マクロファージ、休止状態のマクロファージ、および活性化マクロファージが含まれる。骨髄系細胞系列には、さらに、顆粒球前駆細胞、多形核球由来免疫抑制細胞、分化した多形核白血球、好中球、顆粒球、好塩基球、好酸球、単球、マクロファージ、ミクログリア、骨髄由来免疫抑制細胞、樹状細胞および赤血球が含まれるが、これらに限定されない。ミクログリアは、たとえば骨髄系前駆細胞から分化することができる。本明細書で提供される細胞の実施形態のいくつかにおいて、該細胞は骨髄系細胞である。

30

【0141】

本明細書で述べる「造血幹細胞」すなわち「HSC」は、骨髄系細胞に分化することができる前駆細胞であり、該骨髄系細胞としては、たとえば、マクロファージ、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞およびリンパ系細胞(たとえば、T細胞、B細胞、NK細胞など)が挙げられる。HSCは3種の幹細胞を含む異種細胞集団であり、これら3種の幹細胞は血液中のリンパ系子孫細胞と骨髄系子孫細胞の割合(L/M)によって区別される。本明細書で提供される細胞の実施形態のいくつかにおいて、該細胞は造血幹細胞である。「対象」または「患者」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば実験、診断、予防および/または治療を目的として、本明細書に記載の実施形態を使用または投与してもよい任意の生物が挙げられるが、これらに限定されない。対象または患者として、たとえば、動物が挙げられる。いくつかの実施形態において、前記対象は、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類およびヒトである。いくつかの実施形態において、前記対象は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、霊長類またはヒトである。いくつかの実施形態において、前記対象はヒト男性である。

40

【0142】

50

本明細書で述べる「養子細胞療法」または「養子細胞移入」は、細胞の移入を指し、最も一般的には、免疫系細胞を同じ患者に戻す細胞移入、または新たな宿主に免疫機能および免疫特性を移入する目的で免疫系細胞を新たなレシピエント宿主に移入することを指す。いくつかの実施形態において、養子細胞療法または養子細胞移入は、BTK発現用細胞を必要とする対象にBTK発現用細胞を投与することを含む。

【0143】

BTKは、B細胞および骨髄系細胞において発現され、これらの細胞系列において正常な機能的反応に寄与している。BTKが発現されないと、XLAを発症する。一方、活性化BTKまたは野生型BTKが過剰に発現されると、細胞の形質転換が起こったり、かつ/または細胞の発生が停止することがある（“Early arrest in B cell development in transgenic mice that express the E41K Bruton's tyrosine kinase mutant under the control of the CD19 promoter region” J Immunol. 1999 Jun 1;162(11):6526-33；“Correction of B-cell development in Btk-deficient mice using lentiviral vectors with codon-optimized human BTK.” Leukemia. 2010 Sep;24(9):1617-30；これらの文献は参照によりその全体が本明細書に援用される）。また、野生型BTKの発現調節異常は、自己抗体の産生を促進し、自己免疫のリスクを増加させる（“Enhanced Expression of Bruton's Tyrosine Kinase in B Cells Drives Systemic Autoimmunity by Disrupting T Cell Homeostasis.” J Immunol. 2016 Jul 1;197(1):58-67；この文献は参照によりその全体が本明細書に援用される）。したがって、XLAにおける安全な臨床遺伝子療法を成功させるには、通常であれば免疫タンパク質を発現する各細胞系列においてBTKの発現を回復させること、および通常は免疫タンパク質を発現しない発生過程の各サブセットにおいて過剰発現を引き起こさないように発現を厳密に制御することが必要である。また、このような発現制御によって細胞機能の改変が促されてもよい。この課題を解決するため、本発明の実施形態で述べるように、XLAを有するヒト対象から得た造血幹細胞（HSC）を使用した新規ヒト細胞モデルおよびマウスXLA動物モデルにおいて、ウイルスベクター候補を包括的に評価した。プロモーター、インスレーターおよびエンハンサーの各候補、ならびにコドン最適化したヒトBTK cDNA構築物の設計と試験を繰り返し、この結果に基づき、エクスピボにおけるBTK欠損宿主への形質導入および移植を実施することによって、（マウスまたはヒトの）造血幹細胞に由来するB細胞および骨髄系細胞においてBTKの発現を維持することが可能な、レンチウイルス（LV）を用いた新規ベクター構築物を特定した。この新規ベクター構築物については、本発明の実施形態において述べている。本発明の実施形態によるこのユニークな構築物は、末端切断型遍在性クロマチンオープニングエレメント（UCOE）と、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座のイントロン領域に由来する保存されたエンハンサーエレメントとを利用しており、コドン最適化されたヒトBTK cDNAの発現を誘導することができる。代表的な実施形態のいずれか1つによるこの最適なレンチウイルス（LV）ベクターを、0.7 UCOE.DHS4.BTKpro.coBTKと呼ぶ。本発明の実施形態で述べる研究の一部において、この構築物を選択するに至った予想外の驚くべき一連の結果が得られた。これを以下に述べる。

1) いくつかの実施形態において示すように、BTK最小プロモーターのみを含むレンチウイルスでは、B細胞の発生またはその機能を回復させるには不十分であった。

2) いくつかの実施形態において示すように、E μ エンハンサーエレメントを利用したレンチウイルス（B細胞系列特異的プロモーターまたはBTK最小プロモーターを含む）は、クラススイッチを起こした病原性IgGアイソタイプなどの、高力価の自己抗体の産生を誘導したことから、このエンハンサーを使用すると安全性に顕著な懸念が生じることが示された。

3) 二次レシピエント動物において使用した複数のレンチウイルスプラットフォーム候補において、レンチウイルスベクターの発現のサイレンシングが観察されたため、このようなサイレンシングに耐性を示すUCOEエレメントを利用することとした。

4) 大きなUCOEエレメントを使用すると、力価が低くなったため、力価と機能を向上させるとともに、サイレンシングに対する耐性を維持可能な、0.7 kbの新規な末端切断

型エレメントを設計し、試験を行った。

5) バイオインフォマティクスツールを利用して、BTK遺伝子座に由来する複数のエンハンサー候補を同定し、試験を行い、さらに有意性検定を実施後、ウイルス力価を低下させることなく、インビボにおいてBTKの発現を増加させる最適なエレメントとしてDHS4を特定した。

6) コドン最適化した別の複数のヒトBTK cDNAを試験し、最も良好にBTKの発現を回復することができる構築物を特定した。

7) XLAを有する複数の成人対象から造血幹細胞(HSC)を採取し、免疫欠損NSGマウスに移植した。この結果、これらのHSCによって、XLA対象で見られるB細胞の発生障害が再現された。

8) 本発明の実施形態のいくつかにおいて、本明細書に記載の最適化された新たなレンチウイルス構築物を使用すると、XLA患者由来のHSCに効率的に形質導入できることが示された。

【0144】

X連鎖無グロブリン血症(XLA)は、BTK(ブルトン型チロシンキナーゼ)遺伝子の変異によって引き起こされる遺伝的性のX連鎖免疫不全症である。この疾患は、男性100,000人に約1人の割合で生じる。臨床症状としては、成熟B細胞および血清中免疫グロブリンの欠損; 莢膜を持つ細菌による肺感染症、副鼻腔感染症および皮膚感染症に対する易感染性; 細菌性敗血症による急死のリスク; 腸内ウイルスによる慢性感染症および全身感染症; 慢性炎症性腸疾患; および悪性腫瘍(大腸癌やその他の種類のがん)のリスクの増加を挙げることができる。

【0145】

XLAの治療法として現在選択可能なものとして、プールされたヒト免疫グロブリン(免疫グロブリン大量静注療法(IVIg)または皮下注用免疫グロブリン製剤(SCIg))を3~4週ごとに、生涯にわたって投与することを挙げることができる。しかしながら、これらの治療法は費用がかかり、このような現在の治療法でも、感染症や急死のリスクがある。

【0146】

遺伝子療法を実施する対象の候補として、1つの遺伝子を原因とする造血障害を有する対象が挙げられる。

【0147】

ブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)は、細胞内に見られる非受容体タンパク質チロシンキナーゼであり、B細胞受容体のシグナル伝達経路として主に機能する。BTKは、B細胞の生存、増殖および分化を促進する。また、BTKは、BCR(B細胞受容体)の結合により誘導されたカルシウムシグナルの維持を持続させることができ、これによりNF- κ Bの活性化を促進する。さらに、BTKは、サイトカイン、成長因子およびTLRのシグナル伝達経路においても一定の役割を果たしている。BTKの役割を図21に示す。この図では、BTKがB細胞の発生を誘導することが示されている。また、図に示すように、XLAでは、プレB細胞期でB細胞の発生が停止する。BTKは、B細胞系列および骨髄系細胞系列で発現されるが、T細胞では発現されない。内在性BTKの発現プロファイルを図16に示す。

【0148】

BTKに関連して、レンチウイルスベクターにおけるBTKプロモーターや本発明の実施形態によるさらなる修飾の使用を調査した報告はこれまでにない。プロモーターの機能に関する過去の研究では、BTKプロモーターやBTKの第1イントロンについて一部評価がなされているが、ヒトBTK遺伝子座に由来するエンハンサー候補(DHS4エレメントなど)について報告や試験を行った研究グループはない(“Analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene promoter reveals critical PU.1 and SP1 sites.” Blood. 1996 Feb 1; 87(3):1036-44; “Cell specific expression of human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene (Btk) is regulated by Sp1- and Spi-1/PU.1-family members.” Oncogene. 1996 Nov 7;13(9):1955-64; “Large-scale comparative sequence analysis of the human and murine Bruton's tyrosine kinase loci reveal

10

20

30

40

50

s conserved regulatory domains.” *Genome Res.* 1997 Apr;7(4):315-29.; “ Synergistic activation of the human Btk promoter by transcription factors Sp1/3 and PU.1.” *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 7;259(2):364-9; “ Btk expression is controlled by Oct and BOB.1/OBF.1.” *Nucleic Acids Res.* 2006 Mar 31;34(6):1807-15; “ Proteasome-dependent autoregulation of Bruton tyrosine kinase (Btk) promoter via NF-kappaB.” *Blood.* 2008 May 1;111(9):4617-26.; これらの文献はいずれも参照によりその全体が本明細書に明示的に援用される)。

【 0 1 4 9 】

単独で単離されたコドン最適化BTK cDNAは過去に同定されている (“ Correction of B-cell development in Btk-deficient mice using lentiviral vectors with codon-optimized human BTK.” *Leukemia.* 2010 Sep;24(9):1617-30; この文献は参照によりその全体が本明細書に援用される)。レンチウイルスベクターにおけるUCOEエレメントの単独使用、またはUCOEエレメントと系統特異的プロモーターもしくは遍在性プロモーターとの併用は他の研究者によって調査されているが、この技術をBTKに適用した研究者はいない (“ Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells.” *Blood.* 2007 Sep 1;110(5):1448-57.; “ A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors.” *Mol Ther.* 2010 Sep;18(9):1640-9; “ Physiological regulation of transgene expression by a lentiviral vector containing the A2UCOE linked to a myeloid promoter.” *Gene Ther.* 2012 Oct;19(10):1018-29; “ Correction of murine Rag2 severe combined immunodeficiency by lentiviral gene therapy using a codon-optimized RAG2 therapeutic transgene.” *Mol Ther.* 2012 Oct;20(10):1968-80; “ Promoter and lineage independent anti-silencing activity of the A2 ubiquitous chromatin opening element for optimized human pluripotent stem cell-based gene therapy.” *Biomaterials.* 2014 Feb;35(5):1531-42.; “ A ubiquitous chromatin opening element prevents transgene silencing in pluripotent stem cells and their differentiated progeny.” *Stem Cells.* 2013 Mar;31(3):488-99; “ Lentiviral MGMT(P140K)-mediated in vivo selection employing a ubiquitous chromatin opening element (A2UCOE) linked to a cellular promoter.” *Biomaterials.* 2014 Aug;35(25):7204-13; “ Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells.” *Gene Ther.* 2017 Mar 27; これらの文献はいずれも参照によりその全体が本明細書に明示的に援用される)。

【 0 1 5 0 】

本発明の実施形態に記載の最適化されたレンチウイルスベクターは、X連鎖無グロブリン血症(XLA)を有する対象の遺伝子療法において使用され、この疾患において長期的な根治療法を実施できるように設計されている。遺伝子療法用の最適なBTKレンチウイルスベクターの開発における代表的な実施形態を図22に示す。このレンチウイルスベクターによって、安全なウイルス送達プラットフォームを提供し、最適なタンパク質発現量を有する所望の細胞系列を発現させることができる。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態において、前記最適化されたBTKレンチウイルスベクターは、遍在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)を含む。このUCOEは、組み込み部位に関係なく、導入遺伝子の安定な発現を誘導することができ、隣接したプロモーターにサイレンシングに対する耐性を付与することができる(図1参照)。

【 0 1 5 2 】

さらに、BTK発現用の前記最適化されたレンチウイルスベクターは、細胞においてBTKの発現を増加させることが示された。いくつかの実施形態において使用した代表的なベク

ターのいくつかを図 2 3 に示す。図 2 4 に示すように、E μ BTKpプロモーターを含むレンチウイルスベクターは、骨髄系細胞におけるBTKの発現も増加させた。

【0153】

DKO mock、BTKp、UCOE.BTKpまたはE μ .BTKpを形質導入した細胞において、BTKの発現を試験した。FACSアッセイの結果に示したように、BTK発現用のレンチウイルスベクターにE μ を組み込むと、BTKpプロモーターのみを使用した場合やBTKpプロモーターとUCOEエレメントを併用した場合と比べて、B細胞および骨髄系細胞においてBTKの発現が最も増強されることも示された(図 2 5)。ノックアウト細胞と野生型細胞をB細胞および単球について比較した図 2 6 に示すように、形質導入細胞におけるBTKの発現は、BTKを天然に発現する野生型細胞に匹敵するものである。

10

【0154】

このレンチウイルスベクターによって、根治療法、特にXLA遺伝子療法における根治療法が可能になると考えられる。

【0155】

本明細書に記載の実施形態で述べた遺伝子送達プラットフォームは、XLA治療法に特化したものである。この遺伝子送達プラットフォームによって、B細胞および骨髄系細胞において内在性BTKの発現を回復させることができ、XLAに罹患した対象における免疫応答を回復させることができる。さらに、ベクターの安全性プロファイルも評価した。過去に研究されたXLA用のレンチウイルスベクターは、BTKの最小プロモーター、免疫グロブリン重鎖 μ イントロンエンハンサー、1.5 kbの遍在性クロマチンオープニングエレメントなどの、プロモーターエレメントおよび転写エレメントを含むものであった。しかしながら、本発明の実施形態において示すように、B細胞および骨髄系細胞においてBTKの発現を向上させるためにはさらなる改良が必要であった。

20

【実施例】

【0156】

XLA用の遺伝子送達プラットフォームの最適化

本明細書の実施形態に示すように、いくつかの工程を実施して、遺伝子療法用のレンチウイルス(LV)ベクターの改良を行った。まず、1)UCOEエレメントのサイズを0.7kbまで減らしてウイルス力価を向上させ、次に、2)B細胞および骨髄系細胞において発現を向上させることが可能な、内在性ヒトBTK内の転写エレメントを同定し、BTKプロモーターの上流に含まれる保存された非コード配列(CNS)とともに発現させる試験を行った(図 1)。本明細書に記載の実施形態において前臨床モデルで試験したレンチウイルスベクターとして、0.7UCOE.BTKp.BTKおよび0.7UCOE.I-4,5.BTKp.BTKが挙げられる(図 2 参照)。図 3 に示すように、XLAマウスから血液を採取し、Lin陰性細胞を回収した。次に、LC-huBTK-LVを使用して、この細胞に形質導入した。次に、形質導入した細胞をXLAマウスに投与し、細胞移入の20~25週間後にマウスを分析した。BTKの発現は、フローサイトメトリーにより分析した。また、前記幹細胞を長期生着させるため、二次細胞移入を実施した(図 3 参照)。XLA遺伝子療法を検討するための前臨床マウスモデルを図 3 の模式図に示す。

30

【0157】

ヒトBTKを発現するどちらのベクター(0.7UCOEおよび0.7UCOE-I4,5)も、罹患した造血細胞におけるBTKの発現を回復させ、B細胞の発生と機能を回復し、免疫応答を回復させた(図 4 ~ 図 7)。一方、0.7UCOE.I-4,5.BTKp.BTKは、0.7UCOE.BTKp.BTKと同程度にBTKを効果的に発現したが、ウイルスの組み込み数は少ないことが示された(図 8)。以上のことから、いくつかの結論が得られた。

40

【0158】

内在性BTKと関連する(BTKのイントロン4およびイントロン5に由来する)保存されたBTK制御エレメントを含むレンチウイルス(LV)ベクターは、ウイルス組み込みあたりのBTKの発現を向上させることができる。また、0.7UCOE.I4,5.BTKpBTKレンチウイルスベクターは、XLAの遺伝子療法のための効率的な候補を含んでいる。

50

【 0 1 5 9 】

さらに拡充した前臨床試験では、a) 毒性、安全性および有効性を十分に評価するためのマウスモデルの構築（二次移植の実施および組み込み部位の分析を含む）；b) インビトロにおける不死化アッセイおよびトランス活性化アッセイ；c) B細胞および骨髄系細胞においてBTKの発現を向上可能な、イントロン4およびイントロン5内の遺伝因子の精査；ならびにd) 健常コントロールまたはXLA対象から得たCD34+幹細胞を使用したインビトロまたはNSGレシピエントマウスにおける0.7UCOE.I-4,5.BTKp.BTKの評価を実施する。

【 0 1 6 0 】

UCOEをインスレーターとして用いたBTKプロモーターの利用によるマウスXLAモデルでのレンチウイルス遺伝子療法の安全性と有効性の向上

10

マウスにおけるレンチウイルス遺伝子療法の安全性と有効性を最適化するために、UCOEをインスレーターとして用いたBTKプロモーターを利用して実験を行った。この実験では、ベクター構築物として、WT Mock、KO Mock、BTKp、1.5.UCOE.BTKpおよびE μ .BTKpを使用した。

【 0 1 6 1 】

4種のレンチウイルス(LV)構築物の発現プロファイルと、一次レシピエントマウスにおけるB細胞の発生と機能の回復を図9に示す。ベクターとして、BTKpro.BTK、1.5UCOE.BTKpro.BTK、1.5UCOE.BTKpro.coBTK(コドン最適化したヒトBTK)およびE μ .BTKpro.BTKを使用した。図9に示すように、E μ .BTKp.hBTKベクターは、いずれの細胞でもBTKの発現を増加させることが示された。また、E μ .BTKp.hBTKベクターは、図10に示すように、いずれの細胞でもIgGの発現を増加させることが示された。さらに、E μ .BTKp.hBTKベクターは、図11に示すように、顆粒球、骨髄B細胞および脾臓B細胞においてもBTKの発現を増加させることが示された。また、1.5kbUCOE.BTKpベクターおよび1.5kbUCOE.BTKp.coベクターは、一次レシピエントおよび二次レシピエントにおいて、コピー数が少なくてもBTKの発現を維持することが示された(図11)。

20

【 0 1 6 2 】

0.7kb UCOE.BTKpro.coBTKレンチウイルスを使用した遺伝子療法で処置したマウスにおいて、罹患した造血細胞系列でBTKの発現の回復が見られ、B細胞が発生した(図12)。

30

【 0 1 6 3 】

また、0.7.UCOE.BTK.coレンチウイルスを用いた遺伝子療法でも、一次レシピエントの細胞においてB細胞の増殖とIgMおよびIgGの分泌増加が認められた(図12)。

【 0 1 6 4 】

さらに、0.7.UCOE.Bkp.coレンチウイルスを用いた遺伝子療法でも、一次レシピエントにおいてB細胞の機能の再構成が認められた(図13)。

【 0 1 6 5 】

遺伝子療法で処置した骨髄細胞をTBK^{-/-}二次レシピエントに連続継代移植した後でも、ウイルスコピー数およびBTKの発現は維持される(図14)。図に示すように、0.7UCOE.BTKp.coで形質導入した細胞は、骨髄および脾臓の好中球、単球、B細胞においてBTKを発現した。遺伝子転写を抑制する修飾であるDNAのメチル化も測定した。

40

【 0 1 6 6 】

0.7UCOE.BTKp.coベクターは、XLAに罹患したCD34細胞において少ないコピー数でBTKの発現を持続することが示された(図15)。XLAに罹患したCD34細胞およびコントロールCD34細胞に、様々な感染多重度(MOI)で0.7UCOE.BTKp.coを形質導入し、インビトロで15日間培養した。図に示すように、XLAに罹患した細胞は、形質導入後に健常コントロール細胞と同様の生存率を示した。

【 0 1 6 7 】

レンチウイルスベクターに含まれるBTKプロモーターを利用して、野生型マウスにおけるBTKの発現を評価した。図に示すように、BTKプロモーターは、マウスにおいて内在性

50

BTKの発現パターンを模倣する(図16)。

【0168】

次に、レンチウイルスベクターにおける発現の増強についてE μ プロモーターを試験した。図17Aに示すように、E μ プロモーターを有する2種のベクターを試験した(T2Aに連結されたGFPに融合した野生型またはヒトコドン最適化されたヒトBTK cDNAとE μ エンハンサーを含むベクター)。ニワトリBTK-/-DT40細胞にBTK-GFP構築物またはcoBTK-GFP構築物を形質導入した。ヒストグラムはGFPおよびBTKの発現を示す(図17B)。BTK-GFP形質導入細胞およびcoBTK-GFP形質導入細胞をIndo-1エステルAM蛍光色素で染色し、抗IgMで刺激した。カルシウムの動員をフローサイトメトリーにより観察した。図に示すように、E μ エンハンサーとヒトBTK cDNAを含み、BTKプロモーターの制御下にあるレンチウイルス構築物は、ニワトリ細胞においてBTK-GFPの発現を制御した。

10

【0169】

さらに、遺伝子療法で処置したKOマウスから得た末梢血中のB細胞および骨髄系細胞におけるBTKの発現をフローサイトメトリーで分析し、代表的なプロットに示した(図18)。試験したベクターは、WT Mock、KO Mock、BTKp、1.5kb.UCOE.BTKp、1.5kb.UCOE.BTKp.coおよびE μ .BTKpであった。遺伝子療法で処置したマウスの骨髄細胞を早期B細胞発生マーカーで染色した代表的なフローサイトメトリープロットを図18Cに示す。Hardy分類に従った分画I(IgMlo、IgDhi)、分画II(IgMhi、IgDhi)、分画III(IgMhi、IgDlo)(この順で成熟度が低下する)に含まれるB細胞の割合(%)を示すグラフを図18Dに示す。各層のリングは1匹のマウスを示し、各分画中のB細胞の割合の平均値(%)を円グラフの中に示す。データは、11回の独立した実験の平均値 \pm SEMを示し、n=18(WT Mock)、n=14(KO Mock)、n=7(BTKp)、n=43(1.5kb.UCOE.BTKp)、n=18(1.5kb.UCOE.BTKp.co)、n=23(E μ .BTKp)とした。グラフに示したように、E μ エンハンサーを含むベクターによって、B細胞と骨髄系細胞の両方でBTKの高発現とIgGの分泌増加が達成された。

20

【0170】

また、図19に示すように、E μ .BTKp一次移植マウスは、Mockベクターを形質導入した細胞で処置したコントロールXLAマウスと比べて生存率が延長した。

【0171】

WT Mockベクター、1.5kb.UCOE.BTKpベクターまたはE μ .BTKpベクターで形質導入した細胞で処置したマウスから得た血清を、自己抗原アレイで分析し、88種のマウス抗原に対して反応性を示すIgMおよびIgGのレベルを調べた。各行のデータをZスコアに変換した。Zスコアでは、最も低い反応性(赤色)から最も高い反応性(青色)までが比色定量スケールで示される。図20に示すように、最も高い反応性を示した血清は、E μ プロモーター(E μ .BTKp)を含むレンチウイルスベクターで形質導入した細胞で処置したマウスから得られたものであった。

30

【0172】

B細胞および単球においてBTKの発現を増加させるためのベクターの設計

さらに、B細胞特異的プロモーターがBTKの産生に及ぼす影響について調べた。代表的な一実施形態に従って、ヒトBTK(huBTK)をコードする遺伝子に融合したB細胞特異的プロモーターB29とE μ エンハンサーエレメントを含むレンチウイルスベクターを作製した(図27)。図に示すように、このベクターは、B細胞におけるBTKの発現を増加した。これに対して、単球におけるBTKの発現はノックアウト細胞と同程度であった(図27)。

40

【0173】

また、レンチウイルスベクターに含まれるBTKプロモーターがBTKの発現に及ぼす影響を評価するため、別の一実施形態においてBTKプロモーター領域を調べた。図28に示すように、ヒトBTK(huBTK)をコードする遺伝子に融合したBTKプロモーター(BTKpro)を含むレンチウイルスベクターを作製した。図に示すように、BTKプロモーターはB細胞におけるBTKの発現を増加したが、野生型細胞における発現に及ぶものではなかった。

50

単球では、前記BTKプロモーター領域を含むこのレンチウイルスベクターでは、BTKの発現を増加することはできず、BTKの発現はロックアウト細胞におけるものと同程度であった。

【0174】

ヒトBTKをコードする遺伝子に融合したBTKプロモーター（BTKpro）と偏在性クロマチンオープニングエレメントを含むレンチウイルスベクターを作製した（図29）。図に示すように、これらのエンハンサーエレメントとプロモーターが協働して、B細胞と単球の両方においてBTKの発現を増加した。しかし、この発現は野生型細胞における発現に及ぶものではなかった。

【0175】

ヒトBTKをコードする遺伝子に融合したBTKプロモーター（BTKpro）とEμエンハンサーを含むレンチウイルスベクターを作製した（図30）。図に示すように、これらのエンハンサーエレメントとプロモーターが協働して、B細胞と単球の両方においてBTKの発現を増加した。実験の結果、これらの形質導入細胞におけるBTKの発現量は、野生型細胞におけるBTKの発現量を超過していたことが示された。データから、試験したベクターからのBTKの発現の大部分は、Eμエンハンサーによるものであったことが示された。

【0176】

本明細書において使用した代表的な構築物を以下に示す。

- 1. 0.7UCOE.BTKp.coBTK.
- 2. 0.7UCOEfwd.BTKp.coBTK
- 3. 0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK
- 4. 0.7UCOEfwd.DHS4.BTKp.coBTK
- 5. 0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK
- 6. 0.7UCOEfwd.IE.BTKp.coBTK
- 7. 0.7UCOE.BTKp.co2BTK
- 8. 0.7UCOEfwd.BTKp.co2BTK
- 9. 0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2BTK
- 10. 0.7UCOEfwd.DHS4.BTKp.co2BTK
- 11. 0.7UCOE.IE.BTKp.co2BTK
- 12. 0.7UCOEfwd.IE.BTKp.co2BTK

概して、これらの構築物には、3種のエレメント（0.7UCOE、エンハンサーまたはBTKコード配列；BTKプロモーターはいずれの構築物でも同じ）が様々な組み合わせで含まれている。

【表1】

0.7UCOE:		エンハンサー:			プロモーター	コドン最適化したヒトBTK:	
0.7UCOE	0.7UCOEfwd	なし	DHS4	IE	BTKp	coBTK	co2BTK

【0177】

ヒトコドンを最適化したBTK

BTKをコードする遺伝子のヒトコドンを最適化した。ヒトコドンの最適化は、当業者に公知のアルゴリズムを使用して、ヒトにおいて高収率でmRNAおよびタンパク質を産生できるように最適化された合成遺伝子転写物を作製することによって実施できる。図17に示すように、細胞においてBTKの発現を増加させる能力について2種の構築物を試験した。これらのレンチウイルス構築物は、EμエレメントとBTKプロモーター領域を含んでいた。発現させる遺伝子として、BTKまたはヒトコドンを最適化したBTKを使用し、これらはいずれもGFP遺伝子転写物に融合させた。図17に示すように、ヒトコドンを最適化したBTKによって、GFPが増加し（MFI：2288）、GFPも増加した。

【0178】

BTKレンチウイルスベクターの発現プロファイル

数種類のベクターの発現プロファイルを調べた。ベクターとして、WT Mock、DKO Mock、BTKp (BTKプロモーター)、UCOE.BTKp (偏在性クロマチンオープニングエレメント+BTKプロモーター)、UCOE.BTKp.co (偏在性クロマチンオープニングエレメント+BTKプロモーター+コドン最適化したヒトBTK) およびE μ .BTKp (E μ エレメント+BTKプロモーター)を使用した。図3 1および図3 2に示すように、E μ エレメントとBTKプロモーターを含むBTK発現用レンチウイルスベクターで形質導入した場合に、骨髄、脾臓および腹腔から得たB細胞および骨髄系細胞におけるBTKの発現が最も高くなった。

【0179】

B細胞の発生および成熟B細胞サブセットの回復

さらに、各ベクターで形質導入した細胞について、成熟B細胞サブセットの回復を調べた。ベクターとして、WT Mock、DKO Mock、BTKp (BTKプロモーター)、UCOE.BTKp (偏在性クロマチンオープニングエレメント+BTKプロモーター)、UCOE.BTKp.co (偏在性クロマチンオープニングエレメント+BTKプロモーター+コドン最適化したBTK) およびE μ .BTKp (E μ エレメント+BTKプロモーター)を使用した。XLAでは、B細胞の発生はプレB細胞で停止する。これを踏まえて、プレB細胞以降の発生についてB細胞をさらに調べた。プレB細胞以降の発生は、BTKの量に依存する。図に示すように、E μ エレメントとBTKプロモーターを含むBTK発現用レンチウイルスベクターで形質導入した場合に、末梢中成熟B細胞集団の特徴を有する細胞が得られ、このことから、形質導入細胞から産生されたBTKの量に応じて、マウスの成熟B細胞サブセットが回復することが示された(図3 3)。

【0180】

また、BTK欠損マウスにBTK発現細胞を投与し、再構成された各B細胞集団の細胞数を調べた。各ベクターを細胞に導入した。ベクターとして、WT Mock、DKO Mock、BTKp (BTKプロモーター)、UCOE.BTKp (偏在性クロマチンオープニングエレメント+BTKプロモーター)、UCOE.BTKp.co (偏在性クロマチンオープニングエレメント+BTKプロモーター+コドン最適化したヒトBTK) およびE μ .BTKp (E μ エレメント+BTKプロモーター)を使用した。図3 4は、BTKを発現させるために、形質導入細胞を投与した40匹のレシピエントマウスから得た知見をまとめたデータを示す。UCOE.BTKp.co、E μ .BTKpまたはUCOE.BTKpを含むBTK発現ベクターで形質導入した細胞を投与したマウスでは、骨髄、脾臓および腹腔において成熟B細胞の発生が認められた。したがって、本発明の態様は、偏在性クロマチンオープニングエレメント、BTKプロモーターおよびコドン最適化したヒトBTKを含むレンチウイルスベクターに関し、このベクターは、XLAに罹患している対象において成熟B細胞の発生を促進する方法において使用することができる。

【0181】

また、偏在性クロマチンオープニングエレメントとBTKプロモーターを含むレンチウイルスベクター (UCOE.BTKp) またはBTKプロモーター領域に融合したE μ エレメントを含むレンチウイルスベクター (E μ .BTKp) で形質導入した細胞で処置したマウスでも、B細胞の増殖が示された(図3 5)。コントロールとして、WT Mock細胞およびDKO Mock細胞を使用した。抗IgM抗体を使用して各細胞の蛍光活性化セルソーティングを行った。図に示すように、UCOE.BTKpおよびE μ .BTKpの2種のレンチウイルスベクターからBTKを発現した細胞は、B細胞から産生される基本的な抗体であるIgMを発現した。

【0182】

さらに、各細胞をPMAおよびロノマイシンで処理した。PMAは、プロテインキナーゼC (PKC) の活性化に使用され、ロノマイシンは、NFATのシグナル伝達に必要なカルシウム放出の誘導に使用される(図3 5)。

【0183】

図3 6に示すように、UCOE.BTKpおよびE μ .BTKpの2種のレンチウイルスベクターのいずれかで形質導入した細胞を、抗IgMまたはPMA/イオノマイシンで処理すると、野生型と比べて細胞分裂が増加した。また、これらの細胞では、BTKプロモーターのみを有す

10

20

30

40

50

るベクターや、UCOEエレメントとBTKプロモーターを有するベクターと比べて、IgMおよびIgGの総分泌量が増加することが示された（図37）。

【0184】

T細胞依存性免疫応答

さらに、各形質導入細胞をマウスに投与し、T細胞依存性免疫応答を試験した。レンチウイルスベクターとして、WT Mock、DKO、DKO Mock、BTKp、UCOE.BTKp、UCOE.BTKp.co（コドン最適化したヒトBTK）、E μ .BTKp.co（コドン最適化したヒトBTK）またはE μ .BTKpを使用して、細胞に形質導入した。その後、T細胞の免疫応答を評価した。図に示すように、E μ .BTKpレンチウイルスベクターで形質導入した細胞では、IgGおよびIgMの発現量が増加した（図38～図41）。

10

【0185】

また、抗体量は、BTKの発現と関連しており、マウスの生存率とも関連していた。図42に示すように、E μ .BTKpレンチウイルスベクターで形質導入した細胞を投与したマウスでは、DKO Mock細胞を投与したマウスよりも生存率が向上した。

【0186】

さらに、好中球および二次レシピエントマウスにおいてもBTKの発現を評価した。図43に示すように、E μ .BTKpレンチウイルスベクターで形質導入した細胞を二次レシピエントマウスに投与したところ、BTKの発現が増加した。これに対して、BTKpウイルスベクターを投与した二次レシピエントマウスでは、ウイルスコピー数が増加した（図44）。長期生存に関してレンチウイルス療法を評価したところ、UCOE.BTKp.coベクター、UCOE.BTKpベクターおよびE μ .BTKpベクターによってマウスの生存率が延長するという証拠が得られた。

20

【0187】

BTKプロモーターに関して検討したところ、全体として、レンチウイルスベクターにBTKプロモーターが含まれていると、B細胞および骨髄系細胞においてBTKが顕著に発現することが実証された。UCOE.BTKproおよびE μ .BTKproによって、B細胞の発生、B細胞の絶対数、B細胞の増殖および免疫応答が回復する。また、UCOE.BTKproおよびE μ .BTKproによって、骨髄系細胞の発生も回復する。予想外にも、E μ を含むベクターは、自己抗体の産生を高力価で誘導するため、臨床使用に安全ではない可能性がある。UCOE-Btkp-Btkベクターは、UCOEを含まないベクターよりも、はるかに少ないウイルスコピー数で細胞の機能を回復させる。さらに、UCOE-Btkp-Btkベクターは、マウス造血幹細胞（HSC）およびヒト造血幹細胞（HSC）においてマーカーの発現を持続させた。したがって、UCOE.BTKp-coBTKレンチウイルスベクターは、改良されたユニークな臨床ベクタープラットフォームであり、さらに改変を加えることができる。

30

【0188】

別のエンハンサーエレメント

BTKプロモーターにおいて別のエンハンサーエレメントを使用し、細胞におけるBTKの発現を向上させるその能力について評価した。使用したレンチウイルス構築物を図46に示す。図に示すように、1.5kbのUCOEを使用したところ、B細胞においてBTKプロモーターのみの場合よりも向上が見られた。しかしながら、ベクターのサイズが大きいため、そのサイズを縮小し、かつ低いウイルス力価を向上させるための、さらなる改良が必要であった（図46）。

40

【0189】

1.5kbのUCOEの末端を切断して0.7kbのUCOEとし、0.7UCOE.BTKpレンチウイルスベクターを作製した（図2）。図2に示すように、エンハンサーとして機能しうるヒトBTKエンハンサーエレメントをさらに付加して、0.7UCOE.IE.BTKpを作製した。イントロン領域（IE）は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座に由来するイントロン4およびイントロン5を含んでいた。

【0190】

0.7UCOE.BTKpまたは0.7UCOE.IE.BTKpを細胞に形質導入し、図3に概要を示した方

50

法を使用して、得られた細胞をマウスに投与した。図 4 7 に示すように、0.7UCOE.BTKp または 0.7UCOE.IE.BTKp を形質導入した細胞では、BTK の発現と脾臓 B 細胞の数が回復する。さらに、この細胞は、B 細胞の機能をも回復することが示された (図 4 8)。

【0191】

さらに、0.7UCOE.IE を形質導入した細胞の安全性プロファイルは、0.7UCOE を形質導入した細胞よりも改善していることが示された (図 4 9 参照)。図に示すように、0.7UCOE および 0.7UCOE.IE が産生する自己抗体の力価は、自己免疫コントロール (および過去に報告されている Btk プロモーター非含有ベクター) によるものよりも低く、0.7UCOE.IE は、細胞 1 個あたりのウイルスの組み込み数が少ないにも関わらず同等の有効性を呈する。

【0192】

DNase 高感受性領域を含む BTK 構築物の試験

DNase 高感受性領域 (DHS) を使用して BTK 発現用レンチウイルス構築物を設計した (図 5 0)。得られたベクターは、0.7UCOE.BTKp.coBTK ベクター (0.7UCOE エンハンサー、BTK プロモーターおよびコドン最適化したヒト BTK) および 0.7UCOE.IE4,5,.BTKp.coBTK ベクター (0.7UCOE エlement、ヒト BTK 近位プロモーターと関連するヒト BTK 遺伝子座のイントロン 4 およびイントロン 5、BTK プロモーターおよびコドン最適化したヒト BTK) であった。

【0193】

図 5 1 に示すように、様々な DNase 高感受性領域が同定された。

【0194】

同定したイントロンおよび DNase 高感受性領域に基づいて、イントロン候補および DNase 高感受性領域候補を含む構築物を構築した (図 5 2)。作製した構築物は、0.7UCOE.BTKp.coBTK、0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK、0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK、0.7UCOE.DHS1,2.BTKp.coBTK、0.7UCOE.DHS1,2,4.BTKp.coBTK、および 0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.coBTK であった。

【0195】

DNase 高感受性領域を含む構築物と 0.7UCOE ベクターおよび 0.7UCOE.IE ベクターとをインピボで比較した。実験のセットアップでは、 1×10^6 個の細胞あたり $40 \mu\text{l}$ のウイルス (ウイルス数 (ウイルスコピー数) がそれぞれ同じになるように最適化) を使用して、一晩かけて形質導入した。次に、(移植前に 900 ラドの放射線を照射した) TBKBP マウスに 1 条件あたり 1×10^6 個の細胞を眼窩後注射した。図に示すように、0.7UCOE.BTKp.coBTK で形質導入した細胞は、ウイルスコピー数が多く、BTK の発現量も多かった (図 5 3)。

【0196】

移植の 15 週間後、B 細胞の発生を評価し、末梢血リンパ球の分布を調べた。図 5 4 に示すように、構築した前記ベクターで形質導入した細胞は、KO Mock 細胞よりも B 細胞が増加し、特に 0.7UCOE レンチウイルスベクターでは B 細胞の増加が示された。しかしながら、0.7UCOE エlement を含むレンチウイルスベクターで形質導入した細胞では、リンパ球サブセットにおいて再構成された BTK の量は多かった。

【0197】

UCOE およびイントロンエlement を含むレンチウイルス構築物を、DNase 高感受性領域を含む新たな構築物と比較するために実験を行った。100 万個の細胞あたり $40 \mu\text{L}$ のウイルスを使用して、ウイルス液量をそろえた。図 5 5 に示すように、0.7UCOE エlement を含むレンチウイルスベクターで形質導入した細胞では、DNase 高感受性領域を含むベクターよりも、組み込まれたウイルスのコピー数が多かった。また、この実験において、UCOE と DNase 高感受性領域 4 (DHS4) の間で BTK の発現に有意差は認められなかったが、DHS4 を使用した場合の脾臓における BTK/VCN の割合は、UCOE を使用した場合よりも有意に高かった (図 5 6)。

【0198】

別の一実施形態において、0.7UCOE.BTKp.coBTK ベクター、0.7UCOE.DHS4.BTKp.c

10

20

30

40

50

oBTKベクターおよび0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.coBTKベクターを使用して、インビボでのBTKの発現を調べた。この実験を実施するため、TBKドナーマウスからLin⁻細胞を採取した。形質導入を行うにあたって、100万個の細胞あたり10 μlのウイルスを使用することによりウイルス液量をそろえ（目標：インビトロ試験からの予測に基づいて、組み込まれるウイルスコピー数を約3コピーでそろえる）、ポリブレンを添加したSCGM形質導入培地（mSCF、mTPO）において 4×10^6 個/mlの密度で16時間かけて形質導入を行った。次に、マウス1匹につき 1.5×10^6 個の細胞を投与することにより細胞を移植した（レシピエント：TBKマウス、900ラドの放射線を照射した）（図57）。図57に示すように、0.6UCOE構築物で形質導入した細胞では、ウイルスコピー数が多かったが、BTKの発現量は、DHS4エレメントを含むレンチウイルス構築物を導入した場合と同程度であった。さらに、12週間後に末梢血リンパ球分布を分析したところ、0.7UCOEレンチウイルスベクター、0.7UCOE.DHS4レンチウイルスベクターまたは0.7UCOE.DHS1-4レンチウイルスベクターで形質導入した細胞ではB細胞が増加したことから、これらのレンチウイルスベクターによってBTKの発現が誘導されたことによって、マウスにおいて成熟B細胞が発生したことが示された（図58）。6週間後における末梢血リンパ球の分布を図59に示す。図に示すように、0.7UCOE、0.7UCOE.DHS4または0.7UCOE.DHS1-4からBTKを発現した細胞では、B細胞の産生が増加した（図59）。さらに、0.7UCOEレンチウイルスベクター、0.7UCOE.DHS4レンチウイルスベクターまたは0.7UCOE.DHS1-4レンチウイルスベクターを導入した細胞をマウスに投与し、6週間後および12週間後に評価したところ、B細胞、単球および好中球においてBTKが発現したことが示された（図60）。12週間後の採血実験では、すべてのサブセットにおいてBTKが発現したことが示された（図61）。

【0199】

コドン最適化した別のヒトBTK構築物の試験

コドン最適化したヒトBTK構築物がBTKの細胞発現に及ぼす影響を調べるため、実験を行った。コドン最適化したヒトBTKは、Ngら（“Correction of B cell development in Btk-deficient mice using lentiviral vectors with codon-optimized human BTK.” *Leukemia*. 2010 Sep;24(9):1617-30；この文献は参照によりその全体が本明細書に引用される）によって報告されている。

【0200】

以下の実験は、コドン最適化した2種のヒトBTKを使用した場合のBTKの発現およびBTKの染色を比較することを目的とした。実験のセットアップには、TBKマウスからLin⁻細胞を単離すること；mSCF、mTPOおよびポリブレンを添加した完全SCGM形質導入培地において、 1×10^6 個（ 4×10^6 個/ml）の細胞に対して5 μl、10 μlまたは20 μlのウイルスを添加すること；インビトロで7日間培養すること；7日目にBTK染色およびウイルスコピー数を分析することが含まれていた。使用したレンチウイルス構築物は、0.7UCOE.BTKp.coBTK（力価： 1.17×10^9 ）、0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK（力価： 1.09×10^9 ）、0.7UCOE.BTKp.newcoBTK（力価： 1.81×10^8 ）および0.7UCOE.DHS4.BTKp.newcoBTK（力価： 1.13×10^8 ）であった（図62）。

【0201】

図63に示すように、5 μL、10 μLまたは20 μLのウイルスを加えることにより0.7UCOE.newcoBTKまたはDHS4.newcoBTKで形質導入した細胞では、BTKの発現が増加した。さらに、5 μL、10 μLまたは20 μLのウイルスを加えることにより0.7UCOE.newcoBTKまたはDHS4.newcoBTKで形質導入した細胞においてMFIが増加した（図64）。0.7UCOE.newcoBTKレンチウイルスベクターまたはDHS4.newcoBTKレンチウイルスベクターを10 μL加えることによって形質導入した細胞では、細胞1個あたりにおいて最適なウイルスコピー数が示された（図64）。

【0202】

コドン最適化した当初のヒトBTKとコドン最適化した新たなヒトBTKをインビボにおいて比較することも考慮される。実験群には、0.7UCOE.BTKp.coBTK（力価： 1.17×10^9

10

20

30

40

50

(5匹のマウス)、0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK(力価: 1.09×10^9) (5匹のマウス)、0.7UCOE.BTKp.newcoBTK(力価: 1.81×10^8) (5匹のマウス)、0.7UCOE.DHS4.BTKp.newcoBTK(力価: 1.13×10^8) (5匹のマウス)、KO Mock(3匹のマウス)、WT Mock(5匹のマウス)および放射線非照射コントロール(1匹のマウス)が含まれる。形質導入のセットアップには、(これらのインビボ試験において一貫性をもたせるため)100万個の細胞あたり10 μ lとしてウイルス液量をそろえることが含まれる(図71)。

【0203】

レンチウイルスベクターにおけるUCOEエレメントの方向性の選択に関する試験

UCOEエレメントの方向性がBTKの細胞発現に及ぼす影響を調べるために実験を行った(図66)。UCOEの方向性がBTKの発現に影響を及ぼすかどうかを評価するため、図67に示す構築物を作製した。

【0204】

この実験では、KO Mock、0.7UCOE.BTKp (7.52×10^7)、0.7UCOEfwd.BTKp col4 (6.79×10^8)、0.7UCOEfwd.BTKp col6 (1.79×10^9) およびWT Mockの4種のレンチウイルスベクターを試験した。図68に示すように、0.7UCOE.BTKpレンチウイルスベクター (7.52×10^7) と0.7UCOEfwd.BTKp col4レンチウイルスベクター (6.79×10^8) と0.7UCOEfwd.BTKp col6レンチウイルスベクター (1.79×10^9) の間でのBTKの発現量は同程度であったが、ウイルス液量を増加させるとウイルスコピー数が増えた。

【0205】

実験から分かるように、BTKプロモーターは強力なプロモーターである。UCOEエレメントについて言えば、0.7kbのUCOEは、BTK発現のサイレンシングを効果的に防ぎ、ベクターの力価を増加させる。さらに、UCOEを順方向に配置すると、力価が有意に増加するが、BTKの発現量に変化は見られない。これは、逆方向のUCOEが高力価の構築物と同等に機能することを示している。さらに、エンハンサーエレメントに関して言えば、0.7UCOE.IE.Btkpは、0.7UCOE.Btkpよりも少ないウイルス組み込み数でBTKの発現能を回復させるが、短いエンハンサーエレメント(DHS領域)を付加しても、これよりも長いIE構築物と比べて力価は増加しないことが示された。

【0206】

順方向のUCOEはIEの力価を増加させ、その増加量は1logを上回ることから、順方向のUCOEはすべての構築物において力価を増加させることが示された。

【0207】

たとえば、0.7UCOE.DHS4.Btkpは、0.7UCOE.IE.Btkproよりも強力に、B細胞および骨髄系細胞におけるBTKの発現を増加させることが示された。このことから、0.7UCOE.DHS4.Btkpベクターは、特に強力なベクターであることが示された。

【0208】

コドン最適化したヒトBTKに関して言えば、前述の新たな構築物は、当初のco-Btk構築物よりもBTKの発現を有意に増加させる。

【0209】

ヒト造血幹細胞(HSC)におけるIgG、IgM、NP特異的Ig/Mの試験 - コントロールおよびXLA対象:

レンチウイルスベクターを使用して、インビボにおけるB細胞の発生の回復と、XLAに罹患した細胞の機能の回復を調べた。NSGマウスにおいてXLA患者のB細胞表現型を再現することができるかどうかを評価するために実験を行った。さらに、前記方法において、前述の臨床用レンチウイルスベクターを使用して、XLAに罹患した幹細胞に形質導入することにより、インビボでB細胞の発生を回復させることができるかどうかも検討した。この治療を実施するために選択されたXLA患者を示した表を図71に示す。

【0210】

XLAにおける末梢B細胞の表現型として、B細胞の割合(%)が著しく低いこと、移行期B細胞/未熟B細胞(CD38+CD24+CD10^{high})の割合(%)が高いこと、および成熟

10

20

30

40

50

B細胞 (CD38-CD24-CD10^{low}) が欠損していることが挙げられる。

【0211】

NSGマウスにおけるヒトキメラを、図72のXLA P2患者、P3患者およびP4患者に示した。図に示すように、骨髄では同程度の数のhCD45細胞の生着が見られたが、分化したhCD45細胞の割合(%)は末梢において有意に少なかった。

【0212】

ヒトリンパ球の再構成については、XLA P2患者、P3患者およびP4患者のいずれにおいてもB細胞の割合(%)は骨髄では同程度であったが、脾臓では有意に低い割合(%)となり、骨髄系細胞およびT細胞が相対的に増加していた(図73)。

【0213】

移植したXLA罹患幹細胞の(脾臓における)表現型を、図74のXLA P2患者、P3患者およびP4患者に示す。図に示すように、各患者における成熟B細胞の割合は少なかったが、未熟B細胞の割合は同程度であった(図75)。

【0214】

移植したXLA罹患幹細胞の(脾臓における)表現型を、図76のXLA P2患者、P3患者およびP4患者に示す。図に示すように、XLA群と健常群の間で患者におけるプロB細胞の割合(%)が等しいことが示された。

【0215】

すべてのXLA患者についてB細胞の発生停止を調べた。図77に示すように、BTKによって、プロB細胞から成熟B細胞への分化が可能となる。hCD19⁺、CD22⁺およびCD179a⁺の発現について細胞を分析した。図に示すように、XLA患者は、健常コントロールよりもプレB細胞の割合(%)が有意に高かった。このように、XLAに罹患したB細胞は、脾臓に遊走可能となるプレB細胞期で分化が停止している(図78および図85)。

【0216】

XLAに罹患した細胞において、Ca²⁺の流入によるB細胞の機能を調べた(図80)。図に示すように、XLAに罹患したB細胞では、IgMが発現しているため、コントロールと比較してCa²⁺を流入させることができなかった。

【0217】

XLAに罹患したB細胞を評価したところ、XLAに罹患した細胞では、プレB細胞期でB細胞の発生が停止することが示された(図81)。

【0218】

図に示すように、XLA患者では、脾臓におけるB細胞の数と割合(%)は少なくなっている。さらに、骨髄においてB細胞の発生はプレB細胞期で停止する。次の段階として、NSGマウスにおいてXLA患者のB細胞表現型を再現して、BTKを発現するレンチウイルスベクター系の効果を調べた。

【0219】

0.7UCOE.BTKp.coBTKベクターおよび0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTKベクターを使用し、図83および図90に示す方法に従って、レンチウイルスによるヒト幹細胞への形質導入を行った。

【0220】

レンチウイルスでヒト幹細胞に形質導入したところ、0.7UCOEBTKp.BTKでは、第4のDNase高感受性領域を含むベクターと比べて生存率が70%となった(図85)。

【0221】

また、0.7UCOE.BTK.pBTKレンチウイルスベクターによりXLA P2患者由来の細胞に形質導入したところ、BTKの発現が観察された。非選択環境下での実験で示されたように、0.7UCOE.BTKpBKでは、第4のDNase高感受性領域を含むレンチウイルスベクターと比べてBTKの発現が高かった(図86)。

【0222】

前記実験の結果、XLAに罹患した幹細胞は、0.7UCOE.BTKp.BTKおよび0.7UCOEにより形質導入することができたと結論付けられた。DHS4.BTKp.BTKは、MOI=10において

10

20

30

40

50

1 ~ 2 コピー数で導入され、このウイルスコピー数は臨床的に意義がある。したがって、インビボにおいて、XLAに罹患した幹細胞にレンチウイルスで形質導入することによって、B細胞の発生を回復させることができると考えられる。

【0223】

ヒト造血幹細胞（HSC）の前臨床モデルの構築

T2Aリンカーで自己切断可能な、GFPタンパク質に融合したコドン最適化ヒトBTKを発現するレンチウイルスベクターを使用して、ヒト造血幹細胞（HSC）の前臨床モデルの構築を評価した（図88参照）。図に示すように、試験した構築物は、UCOEエレメント、BTKプロモーター、コドン最適化したヒトBTK遺伝子およびT2A-GFPマーカータンパク質を含む。インビトロにおいて前記レンチウイルスベクターでCD34+HSCの形質導入を行ったところ、形質導入細胞においてGFPが増加した（図88）。次いで、図90に示すように、この細胞をNSGレシピエントマウスに投与した。6ヶ月後のインビボ分析では、B細胞だけでなく骨髄系細胞も増加していることが示された（図89および図97）。

10

【0224】

図92に示す構築物を使用したさらなる試験も考えられる。ENCODEゲノムワイドデータベースから入手可能な、特定の細胞系列の制御マーカに関する情報を利用して、パイオインフォマティクスによるアプローチを行った。保存された非コード配列情報を使用してエンハンサー候補を同定するという流れで制御マーカを見出した。

【0225】

組織特異的なBTKの発現を向上させるため、ヒトとマウスの非コード配列を比較し、高度に保存された領域を同定することによって、保存された非コード配列を同定した。保存された非コード配列をBTKpのすぐ上流にクローニングし、BTKプロモーター（BTKp）と協働して発現を向上することができるかどうかを確認する。最初の読み取りでは、GFPレポーターを使用して発現を追跡した。発現が改善されると、GFPのシグナルすなわち「MFI」が増加する。イントロン4およびイントロン5はMFIを増加させ、イントロン4、イントロン5およびイントロン13を含むコンティグもMFIを増加させることが分かった。GFPは、配列番号8に示される配列によってコードされていた。図92のセット1に示す配列は、配列番号23~30で示される。GFPをコードする試験配列は、配列番号31、配列番号32、および配列番号36~40に示す。

20

【0226】

次に、GFPを使用して、イントロン4、イントロン5およびイントロン13を含むコンティグと、イントロン4とイントロン5のみを含むコンティグをインビトロで再度試験して、これらの比較を行った。イントロン4とイントロン5のみを含むコンティグの方が高いMFIを示した。

30

【0227】

マウス遺伝子療法モデルを使用して、イントロン4とイントロン5のみを含むコンティグをインビボで試験した。イントロン4とイントロン5のみを含むコンティグを、イントロンエンハンサー4,5またはIE4-5と呼ぶ。この研究では、エンハンサーエレメント/プロモーターエレメントを使用して、コドン最適化したヒトBTKコード配列の発現を促進した。この研究の結果、IE4-5を導入することによって、1ウイルスコピー数あたりのBTKの発現が向上することが示された。

40

【0228】

BTKを発現させるための配列をコードするポリペプチドを、配列番号33~35および配列番号41~45に示す。

【0229】

ENCODEデータベースの情報を利用したエンハンサー候補の精査

IE4-5において、エンハンサー活性を発揮するDNAエレメントをより厳密に定義にするため、ENCODEデータベースを使用して、これらのイントロンに含まれるDNase高感受性領域を探索したところ、各イントロンに1つずつDNase高感受性領域が見出されたが、これらのDNase高感受性領域はB細胞および骨髄系細胞では見出されるものの、非関連組織

50

に常に存在するわけではなかった。これらのDNase高感受性領域をそれぞれDHS4およびDHS5と呼ぶ。DHS4およびDHS5は、これらが含まれていたイントロン領域よりもそれぞれ725bpおよび1077bp短かった。B細胞および骨髄系細胞においても、イントロン1内にDNase高感受性領域(DHS1、DHS2およびDHS3)が同定され、イントロン1がインビトロにおいてMFIを増加させる可能性があるという証拠があったことから、これらについても試験を行った。ENCODEを利用したセグメンテーション解析の結果、DHS3およびDHS4が、B細胞において転写エンハンサーとしての特性を有することが特定された。また、DHS5は、CTCF結合部位およびインスレーター候補として特定された。

【0230】

DHS領域1～5の様々な組み合わせについても試験した。

10

【0231】

図92に示す「1kb」および「3kb」は、エンハンサーのサイズを調節するためのイントロン1の非保存配列である。

【0232】

1.5kbのUCOEの末端を切断して0.7kbとし、DNAエンハンサーエレメントとして機能しうる領域を同定することによって、レンチウイルス構築物の力価とBTKの発現を向上できる可能性がある

1.5kbの偏在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)の末端を切断して0.7kbとした結果を図93Aに示す。UCOEエレメントは、ハウスキープ遺伝子CBX3とハウスキープ遺伝子HNRPA2B1が互いに外側に転写されるプロモーター領域にまたがる大きなCpGリッチ領域に存在し、タンパク質発現構築物において使用するために、従来から様々な研究グループによって1.5～2.2kbの長さの領域になるように末端切断が行われている。本実験で使用する1.5kbのUCOEは、CBX3のエキソン1からCBX3の選択的エキソン1を超えて伸びている。この領域を0.7kbのサイズになるように末端切断すると、選択的エキソン1の下流の領域が除去される。(図93B) ENCODEデータベースを利用して、BTK遺伝子のイントロン領域からDNase I高感受性領域(DHS)を同定し、UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assemblyを使用して視覚化した。5つのDHSを同定し、DHS1、DHS2、DHS3、DHS4およびDHS5として順に示した(青色の四角)。ENCODEを利用したゲノムセグメンテーションによって、DHS4の周辺に、予測されたエンハンサーエレメントが同定された(黄色の四角)。エキソンは黒色の四角で示す。配列の長さは、各DHSの下に記載する。これらのDHS配列を様々な組み合わせで0.7UCOE.coBTK構築物にクローニングし、以下のようにしてインビトロで試験した(データ示さず)。以下に示す様々な発現カセットを含むレンチウイルス(LV)でマウスBtk^{-/-}Tec^{-/-}骨髄細胞に形質導入した。次いで、導入遺伝子の発現の平均蛍光強度をフローサイトメトリーで比較した。(図93C) インビトロにおいてマウス(TBK)系統由来の陰性細胞への形質導入実験を実施し、2種のコドン最適化BTKによるBTKの発現量を比較した。この2種のコドン最適化BTKとして、coBTK(図1～2)と、Staalら(Leukemia 2010)によって報告されているコドン最適化BTK(本明細書においてco2BTKと呼ぶ)を使用した。形質導入の7日後のBTKの発現を代表的なフローサイトメトリープロットに示す。(図93D) DHS構築物についてインビトロ試験を行った結果およびcoBTKとco2BTKを比較した結果に基づいて、インビボ試験に使用する4種の構築物を特定した。図に示すように、これらの構築物はRRLバックボーンを有するレンチウイルス構築物であり、いずれかの種類のコドン最適化ヒトBTK(coBTKまたはco2BTK)を発現し、0.7kbの遍在性クロマチンオープニングエレメント(0.7UCOE)を含み、その下流にDHS4が付加されているか、付加されていないものであった。

20

30

40

【0233】

0.7UCOEベクターを使用した遺伝子療法で処置したマウスにおいて、罹患した造血細胞系列でのBTK発現の回復と、B細胞の発生が示された結果を図94に示す。移植の19～23週間後において、BTK+細胞の割合と、再構成された各B細胞サブセットの細胞数および各骨髄系細胞サブセットの細胞数を評価した。(図94A) エンドポイント分析での脾

50

臓B細胞における細胞内BTK染色を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。(図94B~D) 遺伝子療法で処置した群から得た骨髓(図94B)、脾臓(図94C)および腹腔(図94D)中の各リンパ球サブセットにおけるBTK+細胞の割合(%)をフローサイトメトリーで測定した。各細胞サブセットを、好中球(CD11b+GR1+)、単球(CD11b+)およびB細胞(B220+)として定義する。(図94E~F) 骨髓(図94E)、脾臓(図94F)および腹腔(図94G)における各B細胞サブセットの平均細胞数を積み上げ棒グラフに示す。早期B細胞の発生(骨髓)、すなわち、プロB細胞+プレB細胞(IgM⁻、IgD⁻)、未熟B細胞(IgM+IgD⁻)および成熟B細胞(IgM⁺、IgD⁺)を示す。後期B細胞の発生(脾臓)、すなわち、1型移行期(T1)B細胞(CD24^{hi}、CD21⁻)、2型移行期(T2)B細胞(CD24^{hi}、CD21^{int})、辺縁帯/辺縁帯前駆(MZ/MZP)B細胞(CD24^{hi}、CD21^{hi})および濾胞成熟(FM)B細胞(CD24^{int}、CD21^{int})を示す。腹腔内B細胞サブセット、すなわち、B1細胞(IgM+CD43⁺)およびB2細胞(CD43⁻)を示す。(図94H) フローサイトメトリーで測定した各B細胞サブセットにおけるBTKの発現の回復を示す。(図94I) 各実験において、WT Mockで正規化した、B細胞の発生過程におけるBTK+のMFIを示す。データは、4回の独立した実験の平均値±SDを示し、n=13(WT Mock)、n=13(KO Mock)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co2)、n=16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)およびn=6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)とした。P値は、Sidak法を使用した一元配置分散分析により算出した(***P 0.001; **P=0.001~0.01; *P=0.01~0.05)。

10

20

【0234】

インビボおよびインビトロにおけるB細胞の機能の回復を図95に示す。(図95A) 移植の12週間後に、アラム(Alum)を加えたNP-CGGでマウスを免疫化した。免疫化したマウスの血清中のNP特異的IgG濃度をELISAで測定し、IgG標準品に対する相対量として示した。免疫前(-)および一次免疫の10日後(1⁰)に、高親和性NP特異的IgGの血清中濃度を測定した。初回免疫の1ヶ月後に、PBSに加えたNP-CGGをマウスに再投与し、10日後に血清を採取した(2⁰)。(図95B~C) エンドポイント分析(移植の21~23週間後)において、各ベクターで処置したマウスの血清中の総IgG濃度(図95B)および総IgM濃度(図95C)をELISAで測定した。(図95D~F) エンドポイント分析において、CD43⁻細胞を磁気分離することによって脾細胞からB細胞を単離し、Cell Trace Violetで標識し、インビトロにおいてIgM、LPSまたは培地コントロールで刺激した。(図95D) 抗マウスIgM抗体、LPSまたは培地のみを加えて72時間インキュベーション後に1回以上細胞分裂したBTK+B細胞の割合(%)を示す(フローサイトメトリーにより解析した)。(図95E) WT Mockで正規化した、各細胞分裂(D0~D4)後の細胞におけるBTK+のMFIを示す。(図95F) IgMで刺激した72時間後のB細胞におけるCell Trace試薬の希釈に対してBTK染色をプロットし、生細胞とB220+BTK+細胞でゲーティングした代表的なフローサイトメトリープロットである。データは、4回の独立した実験の平均値±SDを示し、n=13(WT Mock)、n=13(KO Mock)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.BTKp.co2)、n=16(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、n=11(0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2)およびn=6(0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co)とした。P値は、Sidak法を使用した一元配置分散分析により算出した(***P 0.001; **P=0.001~0.01; *P=0.01~0.05)。

30

40

【0235】

ベクターの安全性に関する考察を図96に示す。各ベクターで処置したマウスの血清中の抗dsDNA IgG濃度(図96A)および抗dsDNA IgG2c濃度(図96B)をELISAで測定し、吸光度の測定値(OD450)として示した。ポジティブコントロールとして、自己免疫疾患傾向のある公知のWASキメラマウスモデルから得た血清、およびE μ .BTKpで処置したマウスから得た血清を使用した。(図96C) エンドポイント分析において、全骨髓細胞および全脾細胞からゲノムDNAを単離し、細胞1個あたりのウイルスの組み込み数(ウイルスコピー数)をqPCRで定量した。データは、4回の独立した実験の平均値±SDを

50

示し、n=13 (WT Mock)、n=13 (KO Mock)、n=11 (0.7UCOE.BTKp.co)、n=11 (0.7UCOE.BTKp.co2)、n=16 (0.7UCOE.DHS4.BTKp.co)、n=11 (0.7UCOE.DHS4.BTKp.co2) およびn=6 (0.7UCOE.DHS1-5.BTKp.co) とした。P値は、Sidak法を使用した一元配置分散分析により算出した (**P 0.001; **P=0.001~0.01; *P=0.01~0.05)。

【0236】

XLA患者から得たヒト造血幹細胞 (HSC) においてレンチウイルス (LV) ベクターを使用した前臨床モデルの構築

以下の実験は、免疫不全NSGマウスに遺伝子療法用ベクターを移植した場合に、XLAに罹患したヒト造血幹細胞 (HSC) からのB細胞の発生を回復できるかどうかを評価することを目的として行った。CD34細胞は、XLA患者3 (ミスセンス突然変異) および健常ドナーNo.15から得た。形質導入プロトコルは、SCGM培地 (TPO、FLT3およびSCF (各100ng/ml) 中であらかじめ細胞を48時間刺激後、レンチウイルスを1回添加することを含む。レンチウイルスはMOI=5で使用した。使用したレンチウイルスは、0.7UCOE.BTKp.BTK.co2 (力価: 7×10^8) およびDHS4.co2 (力価: 1×10^9) であった。

【0237】

実験マウス: 4匹のマウス = 健常ドナーNo.15 (HD)

【0238】

3匹のマウス = Mock処理XLA P3患者 (XLAP3)

【0239】

5匹のマウス = 0.7UCOE.BTKp.BTK.co2 (0.7UCOE)

【0240】

4匹のマウス = 0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTK.co2 (DHS4)

【0241】

移入の12週間後に分析した (図97)。

【0242】

複数の処置群間で条件を同じにしてヒト造血細胞を骨髄に移植した結果を図98に示す。遺伝子療法を行ったXLA患者由来ヒト幹細胞、または遺伝子療法を行っていないXLA患者由来ヒト幹細胞を、健常ドナー由来のヒト幹細胞と条件を同じにして骨髄に移植した。ヒトおよびマウスのCD45 (造血細胞マーカー)、CD33 (骨髄系細胞) およびCD19 (B細胞)、ならびにCD4およびCD8 (T細胞) を含む、ヒト免疫細胞の様々なマーカーを示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。生きた全骨髄細胞をhCD45+およびmCD45-でゲーティングしてヒト造血細胞分画を得た後、hCD45+でゲーティングした細胞集団においてCD33マーカーおよびCD19マーカーを分析し、さらに、CD33-CD19-でゲーティングした細胞集団においてCD4およびCD8を分析した。(図98Bおよび図98C) 骨髄に移植したヒトCD45細胞の割合 (%) およびhCD45細胞の総数を示す。各コホート (XLA3、XLA3+0.7UCOE.BTKp.BTKco2レンチウイルス、XLA3+0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2レンチウイルスおよび健常ドナー) につきn=4とした。

【0243】

図99は、0.7UCOE.BTKp.BTKco2または0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2を使用した遺伝子療法でXLA患者3由来のHSCを処置し、このHSCを投与したマウスレシピエントの結果を示す。この結果から、脾臓においてヒト造血細胞の数が有意に増加していることが分かる。(図99A) ヒトおよびマウスのCD45 (造血細胞マーカー)、CD33 (骨髄系細胞) およびCD19 (B細胞)、ならびにCD4およびCD8 (T細胞) を含む、ヒト免疫細胞の様々なマーカーを示した代表的なフローサイトメトリープロットである。hCD45+およびmCD45-をゲーティングしてヒト造血細胞分画を得た後、hCD45+でゲーティングした細胞集団においてCD33マーカーおよびCD19マーカーを分析し、さらに、CD33-CD19-でゲーティングした細胞集団においてCD4およびCD8を分析した。(図99Bおよび図99C) hCD45+脾細胞の割合 (%) およびその総数を示す。各コホートにつきn=4とし、*P=0.004 (一元配置分散分析) とした。図100は、XLA患者由来のHSCをレンチウイ

10

20

30

40

50

ルス (0.7UCOE BTKp BTKco2またはDHS4 BTKpBTK.co2を使用) で形質導入し、このHSCを投与したレシピエントの結果を示す。この結果から、XLA患者由来の非処置細胞と比べて脾臓B細胞 (CD19+細胞) の割合が増加していることが分かる。図2に示したフローサイトメトリーの結果を、ヒト免疫細胞の種類別にまとめる。A~C: 脾臓のヒトCD45+細胞中のB細胞 (CD19+)、骨髄系細胞 (CD33+) およびT細胞 (CD4+またはCD8+) の割合 (%) を示す。D~F: 脾臓のヒトCD45+細胞中のB細胞 (CD19+)、骨髄系細胞 (CD33+) およびT細胞 (CD4+またはCD8+) の総数を示す。各コホートにつきn=4とし、**P=0.0044 (一元配置分散分析) とした。

【0244】

B細胞の発生過程で見られる各サブセットを脾臓において調べた代表的なフローサイトメトリープロットを図101に示す。各遺伝子療法コホートにおいて、ヒトB細胞の発生過程で見られる各サブセットを特定するための典型的なゲーティング方法を示す (右側に示す)。各パネルにおいて使用したマーカーを下に示す (Hist = ヒストグラム)。あらかじめゲーティングを行った場合は、各列の上方に示す。ヒトCD19+細胞からヒトCD24細胞およびhCD38細胞をゲーティングした。未熟B細胞 (hCD24+hCD38+) はIgM+IgD-CD10highであり、成熟B細胞 (CD24lowCD38low) はIgM+IgD+CD10lowである。

【0245】

XLA患者3由来のHSCをレンチウイルス (0.7UCOE.BTKp.BTKco2または0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTKco2を使用) で形質導入し、このHSCをレシピエントに移植した結果を図102に示す。図に示すように、このレシピエントでは、XLAコントロールと比べて、脾臓中の未熟B細胞 (CD19+CD24+CD38+B細胞およびCD19+CD24+CD38+IgM+細胞を含む) の割合が増加している。図4に示したフローサイトメトリーの結果を、特定の未熟B細胞の亜集団別にまとめたグラフを示す。A: 脾臓における未熟B細胞 (CD24+CD38+) の割合 (%) を示す。B: IgM+未熟B細胞の割合 (%) を示す。C~D: 脾臓における未熟B細胞 (CD24+CD38+) の総数およびCD24+hCD38+IgM+細胞の総数を示す。E: CD10のヒストグラムの重ね合わせを示し、健常ドナーと比べたCD10の平均蛍光強度 (MFI) の変化を示す。各コホートにつきn=4とし、***P=0.0004; **P=0.0044; *P=0.4 (一元配置分散分析) とした。

【0246】

XLA患者由来のHSCをレンチウイルス (0.7UCOE.BTKp.BTKco2または0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTKco2) で形質導入し、レシピエントに移植すると、XLAコントロールと比べて、成熟B細胞 (CD19+CD24^{low}CD38^{low}IgM+IgD+) の割合が増加することを図103に示す。(図104A~C) 脾臓における成熟B細胞 (hCD24^{low}hCD38^{low}) の割合 (%) とIgM+成熟B細胞およびIgM+IgD+成熟B細胞の割合 (%) を示す。(図103D~F) 脾臓成熟B細胞、IgM+成熟B細胞およびIgM+IgD+成熟B細胞の総数を示す。(図103G) CD10のヒストグラムの重ね合わせであり、CD10のMFIが健常ドナーのものと似ていることを示す。各コホートにつきN=4とし、***P=0.0004; **P=0.0044; *P=0.4 (一元配置分散分析) とした。

【0247】

B細胞の発生過程で見られる各サブセットを骨髄において調べた代表的なフローサイトメトリープロットを図104に示す。各遺伝子療法コホートにおいて、ヒトB細胞の発生過程で見られる各サブセットを骨髄において特定するためのゲーティング方法を示す (右側に示す)。各パネルにおいて使用したマーカーを下に示す (Hist = ヒストグラム)。あらかじめゲーティングを行った場合は、各列の上方に示す。ヒトCD19+細胞からヒトCD24細胞およびhCD38細胞をゲーティングした。骨髄中の未熟B細胞 (hCD24+hCD38+) はIgM+IgD-CD10highである。

【0248】

XLA患者由来のHSCをレンチウイルス (0.7UCOE BTKp BTKco2またはDHS4 BTKpBTK.co2を使用) で形質導入し、レシピエントに移植すると、XLAコントロールと比べて、CD19+CD24+CD38+IgM+未熟B細胞の割合が増加することを図105に示す。図7に示

10

20

30

40

50

したゲーティング方法に基づくフローサイトメトリー分析をまとめたものをグラフに示す。各ドットは、1匹のマウスを示す。(A~D)未熟B細胞(CD24⁺CD38⁺)およびIgM⁺未熟B細胞の割合(%)とその数を示す。(E)CD10のヒストグラムの重ね合わせを示し、健常ドナーと比べたCD10のMFIの変化を示す。青色は、0.7UCOE.BTKp.BTKco2を使用したレンチウイルスで処置した個々のマウスを示し、橙色は0.7UCOE.DHS4.UCOE.BTKp.BTKco2を使用したレンチウイルスで処置した個々のマウスを示す。各コホートにつきn=4とした。一元配置分散分析によって統計学的有意差を算出し、***P=0.0004; **P=0.0044; *P=0.4とした。

【0249】

XLA患者由来のHSCをレンチウイルス(0.7UCOE BTKp BTKco2を含むレンチウイルスまたは0.7UCOE.DHS4 BTKp.BTK.co2を含むレンチウイルスを使用)で形質導入し、レシピエントに移植すると、インビボにおいて細胞1個あたり0.2~2のウイルスコピー数(VCN)で遺伝子が組み込まれることを図106に示す。骨髓(A)および脾臓(B)ならびに移植前のCD34細胞(C)に組み込まれたウイルスを定量PCRで測定し、細胞1個あたりのウイルス組み込み数を算出した。0.7UCOE.Co2.BTKp.BTKとDHS4.BTKp.BTKCo2との間に有意差は見られない。各ドットは1匹のマウスを示す(AおよびB:N=4、C:N=1)。

【0250】

0.7UCOE.BTKp.BTKco2を含むレンチウイルスまたは0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2を含むレンチウイルスを使用した遺伝子療法でXLA患者3由来のHSCを処置し、このHSCをレシピエントに移植すると、インビボにおいてIgM分泌B細胞が産生されることを図107に示す。移植の12週間後に得た血清中の総IgM濃度をELISAで定量した。IgM濃度($\mu\text{g/mL}$)は、ヒトIgM標準品を使用して決定した。各ドットは、1匹のマウスの結果を示し、各コホートにつきN=4とした。

【0251】

0.7UCOE.BTKp.BTKco2を含むレンチウイルスまたは0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKco2を含むレンチウイルスでXLA患者3由来のHSCを形質導入し、このHSCをレシピエントに移植すると、B細胞受容体(BCR)の結合に応答したB細胞によるカルシウム流入が回復することを図108に示す。各コホートのマウスから得た全脾細胞 5×10^6 個をそれぞれプールし、B細胞受容体(BCR)のシグナル伝達に応答した脾細胞によるカルシウム流入を分析した。B細胞受容体(BCR)のシグナル伝達に応答したカルシウム流入は、BTK活性化の下流の重要な事象である。図108Aは、カルシウム流入を評価するための、ヒトCD19⁺細胞のゲーティング方法を示す代表的なフローサイトメトリープロットである。図108Bは、B細胞受容体(BCR)がヒトIgM抗体と結合した後の、フローサイトメトリーによる細胞内カルシウム濃度の動態解析を示す。

【0252】

インビトロにおけるB細胞クラススイッチを示した代表的なフローサイトメトリープロットを図110に示す。レシピエントマウスの脾細胞をB細胞分化誘導プロトコルで培養し(前のスライド)、血漿中B細胞の同定用マーカーを染色した。また、培地上清を回収し、ELISAでヒトIgM濃度およびヒトIgG濃度を測定した。

【0253】

XLA患者由来のHSCをレンチウイルス(0.7UCOE BTKp BTKco2またはDHS4 BTKp BTK.co2を使用)で形質導入し、レシピエントに移植すると、サイトカインおよびT細胞依存性シグナルに応答可能なB細胞が産生され、抗体が分泌されることを図111に示す。 0.5×10^6 個の全脾細胞(各コホートのマウスから得た全脾細胞をそれぞれプールしたもの)を、IMDM + 10%FBS + 2-メルカプトエタノール培地で培養した。第I相では、Meg aCD40L(100ng/ml) + CpG ODN 2006(1 $\mu\text{g/ml}$) + IL-2(50ng/ml) + IL-10(50ng/ml) + IL-15(10ng/ml)の存在下で細胞を7日間培養した。第I相の終了後、細胞をPBSで2回洗浄し、第II相培地(IL-2(50ng/ml) + IL-6(50ng/ml) + IL-10(50ng/ml) + IL-15(10ng/ml))を添加したIMDM + 10%FBS + BME)中で3日間培養し

10

20

30

40

50

、次いで第III相培地 (IL-6 (50ng/ml) + IL-15 (10ng/ml) + IFN- 2B (100U/ml)) を添加したIMDM + 10%FBS + BME) に培地交換し4日間培養した。培養終了後、培地上清を回収し、ヒトIgM標準品およびヒトIgG標準品を使用したELISAにより、ヒトIgG濃度 (A) およびヒトIgM濃度 (B) を測定した。

【0254】

さらなる実施形態

本明細書で述べるように、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の発現維持用ポリヌクレオチドを提供する。該ポリヌクレオチドは、遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE) をコードする第1の配列; プロモーターをコードする第2の配列; およびBTKをコードする第3の配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記UCOEは、2 kb、1.5 kb、1 kb、0.75 kb、0.5 kbもしくは0.25 kb、またはこれらの数値のいずれか2つによって定義される範囲内の長さ (kb) である。いくつかの実施形態において、第1の配列は、配列番号1および/または配列番号2に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターはBTKプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記BTKプロモーターは、配列番号5に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3の配列は、ヒトにおける発現用にコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、第3の配列は、配列番号6または配列番号7に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターはB細胞特異的プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは、B細胞特異的プロモーターB29を含む。いくつかの実施形態において、前記B29プロモーター配列は、配列番号46に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは内在性プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記ポリペプチドは1つ以上のエンハンサーエレメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも1つのDNase高感受性領域 (DHS) を含む。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、DNase高感受性領域1 (DHS1)、DNase高感受性領域2 (DHS2)、DNase高感受性領域3 (DHS3)、DNase高感受性領域4 (DHS4) および/またはDNase高感受性領域5 (DHS5) である。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、配列番号3に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも1つのイントロン領域を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座のイントロン4、イントロン5および/またはイントロン13である。いくつかの実施形態において、前記イントロン領域は、配列番号9に示される配列 (イントロン4)、配列番号10に示される配列 (イントロン5) および/または配列番号11に示される配列 (イントロン13) を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号4、配列番号14または配列番号15に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記UCOEは逆方向または順方向である。いくつかの実施形態において、前記UCOEは順方向である。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号16に示される配列、配列番号17に示される配列、配列番号18に示される配列、配列番号19に示される配列、および/または配列番号20に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、BTKプロモーターの上流の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、BTKプロモーターの上流の前記遺伝子は、BTKエンハンサーである。いくつかの実施形態において、前記BTKエンハンサーは、配列番号21または配列番号22に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリペプチドは、配列番号33、34、35、41、42、43、44または45に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号1に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配

10

20

30

40

50

列番号 4 に示される配列を含む。

【 0 2 5 5 】

さらに、細胞におけるブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の発現維持用ベクターを提供する。該ベクターは、遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE) をコードする第 1 の配列；プロモーターをコードする第 2 の配列；および BTK をコードする第 3 の配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、第 1 の配列は、配列番号 1 および / または配列番号 2 に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは BTK プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、配列番号 5 に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第 3 の配列は、ヒトにおける発現用にコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、第 3 の配列は、配列番号 6 または配列番号 7 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターは B 細胞特異的プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記 B 細胞特異的プロモーターは、B 細胞特異的プロモーター B29 を含む。いくつかの実施形態において、前記 B29 プロモーター配列は、配列番号 4 6 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記 B 細胞特異的プロモーターは内在性プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは 1 つ以上のエンハンサーエレメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記 1 つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも 1 つのイントロン領域を含む。いくつかの実施形態において、前記 1 つ以上のエンハンサーエレメントは、DNase 高感受性領域 (DHS) を含む。いくつかの実施形態において、前記 DNase 高感受性領域は、DNase 高感受性領域 1 (DHS1)、DNase 高感受性領域 2 (DHS2)、DNase 高感受性領域 3 (DHS3)、DNase 高感受性領域 4 (DHS4) および / または DNase 高感受性領域 5 (DHS5) である。いくつかの実施形態において、前記 DNase 高感受性領域は、配列番号 3 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも 1 つのイントロン領域は、ヒト BTK 近位プロモーターと関連するヒト BTK 遺伝子座に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記少なくとも 1 つのイントロン領域は、ヒト BTK 近位プロモーターと関連するヒト BTK 遺伝子座のイントロン 4、イントロン 5 および / またはイントロン 1 3 である。いくつかの実施形態において、前記イントロン領域は、配列番号 9 に示される配列 (イントロン 4)、配列番号 1 0 に示される配列 (イントロン 5) および / または配列番号 1 1 に示される配列 (イントロン 1 3) を含む。いくつかの実施形態において、前記 1 つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号 4、配列番号 1 4 または配列番号 1 5 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記 UCOE は逆方向または順方向である。いくつかの実施形態において、前記 UCOE は順方向である。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、B 細胞系特異的レンチウイルスベクターを用いたベクターである。いくつかの実施形態において、前記細胞は B 細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は CD 3 4⁺ 造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記 1 つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号 1 6 に示される配列、配列番号 1 7 に示される配列、配列番号 1 8 に示される配列、配列番号 1 9 に示される配列、および / または配列番号 2 0 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、BTK プロモーターの上流の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、BTK プロモーターの上流の前記遺伝子は、BTK エンハンサーである。いくつかの実施形態において、前記 BTK エンハンサーは、配列番号 2 1 または配列番号 2 2 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリペプチドまたはベクターは、配列番号 3 3、3 4、3 5、4 1、4 2、4 3、4 4 または 4 5 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、0.7 UCOE は、配列番号 2 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号 3 または配列番号 4 に示される配列を含む。

【 0 2 5 6 】

いくつかの実施形態において、BTK 発現用細胞であって、遍在性クロマチンオープニングエレメント (UCOE) をコードする第 1 の配列；プロモーターをコードする第 2 の配列

；およびBTKをコードする第3の配列を含むポリヌクレオチドを含む細胞を提供する。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、ベクターに組み込まれている。該ベクターは、遍在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)をコードする第1の配列；プロモーターをコードする第2の配列；およびBTKをコードする第3の配列を含んでもよい。いくつかの実施形態において、第1の配列は、配列番号1および/または配列番号2に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターはBTKプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、配列番号5に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3の配列は、ヒトにおける発現用にコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、第3の配列は、配列番号6または配列番号7に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターはB細胞特異的プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは、B細胞特異的プロモーターB29を含む。いくつかの実施形態において、前記B29プロモーター配列は、配列番号46に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは内在性プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは1つ以上のエンハンサーエレメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも1つのイントロン領域を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、DNase高感受性領域(DHS)を含む。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、DNase高感受性領域1(DHS1)、DNase高感受性領域2(DHS2)、DNase高感受性領域3(DHS3)、DNase高感受性領域4(DHS4)および/またはDNase高感受性領域5(DHS5)である。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、配列番号3に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座のイントロン4、イントロン5および/またはイントロン13である。いくつかの実施形態において、前記イントロン領域は、配列番号9に示される配列(イントロン4)、配列番号10に示される配列(イントロン5)および/または配列番号11に示される配列(イントロン13)を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号4(配列番号4:イントロン4~5)、配列番号14または配列番号15に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記UCOEは逆方向または順方向である。いくつかの実施形態において、前記UCOEは順方向である。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、B細胞系特異的レンチウイルスベクターを用いたベクターである。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34⁺造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号16に示される配列、配列番号17に示される配列、配列番号18に示される配列、配列番号19に示される配列、および/または配列番号20に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、BTKプロモーターの上流の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、BTKプロモーターの上流の前記遺伝子は、BTKエンハンサーである。いくつかの実施形態において、前記BTKエンハンサーは、配列番号21または配列番号22に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34⁺造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に示される配列を含む。

【0257】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、B細胞の生存、増殖および/または分化の促進を必要とする対象において、B細胞の生存、増殖および/または分化を促進する方法であって、本発明の実施形態のいずれか1つに記載の細胞、または本発明の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドもしくは本発明の実施形態のいずれか1つに記載のベクターを含む細胞を前記対象に投与すること、任意で、前記細胞を投与する前に、B細胞の生存、増殖および/もしくは分化を促進し得る治療法の恩恵を受け得る対象として前記対象を特定すること、ならびに/または任意で、前記対象もしくは該対象から得られた生体試料において、B細胞の生存、増殖および/もしくは分化を測定することを含む方法を提供する。前記ベクターは、遍在性クロマチンオープニングエレメント(UCOE)をコードする第1の配列;プロモーターをコードする第2の配列;およびBTKをコードする第3の配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、第1の配列は、配列番号1および/または配列番号2に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターはBTKプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、配列番号5に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3の配列は、ヒトにおける発現用にコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、第3の配列は、配列番号6または配列番号7に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターはB細胞特異的プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは、B細胞特異的プロモーターB29を含む。いくつかの実施形態において、前記B29プロモーター配列は、配列番号46に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは内在性プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは1つ以上のエンハンサーエレメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも1つのイントロン領域を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、DNase高感受性領域(DHS)を含む。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、DNase高感受性領域1(DHS1)、DNase高感受性領域2(DHS2)、DNase高感受性領域3(DHS3)、DNase高感受性領域4(DHS4)および/またはDNase高感受性領域5(DHS5)である。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、配列番号3に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座のイントロン4、イントロン5および/またはイントロン13である。いくつかの実施形態において、前記イントロン領域は、配列番号9に示される配列(イントロン4)、配列番号10に示される配列(イントロン5)および/または配列番号11に示される配列(イントロン13)を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号4(配列番号4:イントロン4~5)、配列番号14または配列番号15に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記UCOEは逆方向または順方向である。いくつかの実施形態において、前記UCOEは順方向である。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、B細胞系特異的レンチウイルスベクターを用いたベクターである。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34+造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号16に示される配列、配列番号17に示される配列、配列番号18に示される配列、配列番号19に示される配列、および/または配列番号20に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、BTKプロモーターの上流の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、BTKプロモーターの上流の前記遺伝子は、BTKエンハンサーである。いくつかの実施形態において、前記BTKエンハンサーは、配列番号21または配列番号22に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記細胞は前記対象から得られたものであり、該細胞は、本発明の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドまた

10

20

30

40

50

はベクターを導入することによって遺伝子組換えされている。いくつかの実施形態において、前記投与は養子細胞移入によって行われる。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34+造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記対象は雄性である。いくつかの実施形態において、前記対象はX連鎖無 グロブリン血症(XLA)に罹患している。いくつかの実施形態において、前記対象は、免疫グロブリン置換療法を受けるべき対象として選択された対象である。いくつかの実施形態において、前記対象は、標的化抗微生物剤を投与すべき対象として選択された対象である。いくつかの実施形態において、前記ポリペプチドまたはベクターは、配列番号33、34、35、41、42、43、44または45に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリペプチドまたはベクターは、配列番号33、34、35、41、42、43、44または45に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に示される配列を含む。

10

【0258】

いくつかの実施形態において、X連鎖無 グロブリン血症(XLA)またはXLAに伴う症状の治療、抑制または緩和を必要とする対象において、XLAまたはXLAに伴う症状を治療、抑制または緩和する方法であって、本発明の実施形態のいずれか1つに記載の細胞、または本発明の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドもしくは本発明の実施形態のいずれか1つに記載のベクターを含む細胞を前記対象に投与すること、任意で、XLAもしくはXLAに伴う症状に対する治療法の恩恵を受け得る対象として前記対象を特定すること、および/または任意で、前記対象において、XLAの進行の改善もしくはXLAに伴う症状の改善を測定することを含む方法を提供する。前記ベクターは、遍在性クロマチンオープンニングエレメント(UCOE)をコードする第1の配列；プロモーターをコードする第2の配列；およびBTKをコードする第3の配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、第1の配列は、配列番号1および/または配列番号2に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記プロモーターはBTKプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、配列番号5に示される核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3の配列は、ヒトにおける発現用にコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、第3の配列は、配列番号6または配列番号7に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターはB細胞特異的プロモーターをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは、B細胞特異的プロモーターB29を含む。いくつかの実施形態において、前記B29プロモーター配列は、配列番号46に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記B細胞特異的プロモーターは内在性プロモーターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは1つ以上のエンハンサーエレメントをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、少なくとも1つのイントロン領域を含む。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、DNase高感受性領域(DHS)を含む。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、DNase高感受性領域1(DHS1)、DNase高感受性領域2(DHS2)、DNase高感受性領域3(DHS3)、DNase高感受性領域4(DHS4)および/またはDNase高感受性領域5(DHS5)である。いくつかの実施形態において、前記DNase高感受性領域は、配列番号3に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座に由来するものである。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つのイントロン領域は、ヒトBTK近位プロモーターと関連するヒトBTK遺伝子座のイントロン4、イントロン5および/またはイントロン13である。いくつかの実施形態において、前記イントロン領域は、配列番号9に示される配列(イントロン4)、配列番号10に示される配列(イントロン5)および/または配列番号11に示される配列(イントロン13)を含む。いくつかの実施形態において

20

30

40

50

、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号4（配列番号4：イントロン4～5）、配列番号14または配列番号15に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記UCOEは逆方向または順方向である。いくつかの実施形態において、前記UCOEは順方向である。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、B細胞系特異的レンチウイルスベクターを用いたベクターである。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34+造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のエンハンサーエレメントは、配列番号16に示される配列、配列番号17に示される配列、配列番号18に示される配列、配列番号19に示される配列、および/または配列番号20に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、BTKプロモーターの上流の遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、BTKプロモーターの上流の前記遺伝子は、BTKエンハンサーである。いくつかの実施形態において、前記BTKエンハンサーは、配列番号21または配列番号22に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、B細胞系特異的レンチウイルスベクターを用いたベクターである。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34+造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は前記対象から得られたものであり、該細胞は、本発明の実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチドまたは本発明の実施形態のいずれか1つに記載のベクターを導入することによって遺伝子組換えされている。いくつかの実施形態において、前記投与は養子細胞移入によって行われる。いくつかの実施形態において、前記細胞はB細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は骨髄系細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD34+造血幹細胞である。いくつかの実施形態において、前記対象は雄性である。いくつかの実施形態において、前記対象は、免疫グロブリン置換療法を受けるべき対象として選択された対象である。いくつかの実施形態において、前記対象は、標的化抗微生物剤を投与すべき対象として選択された対象である。いくつかの実施形態において、前記ポリペプチドまたはベクターは、配列番号33、34、35、41、42、43、44または45に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、0.7UCOEは、配列番号2に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記エンハンサーは、配列番号3または配列番号4に示される配列を含む。

10

20

30

【0259】

配列

本発明の実施形態で使用される配列を以下に示す。

【表2】

0.7UCOE :		エンハンサー :			プロモーター	コドン最適化したBTK :	
0.7UCOE	0.7UCOEfwd	なし	DHS4	IE4-5	BTKp	coBTK	co2BTK

40

【0260】

0.7UCOE (配列番号1)

(配列番号1) Cgcgtgtggcatctgaagcaccaccagcgagcgagagctagagagaaggaaagccaccgacttcaccgcctccgagctgctccgggtcgcgggtctgcagcgtctccggcctccgcgctacagctcaagccacatccgaagggggaggagccgggagctgctgcgcggggcgctggggggagggggtggcaccgcccacgccggggcgccacgaagggcggggcagcggggcgcgccggcggggggagggggcgcgccgccccgctgggaattggggcctagggggagggcgggagggcgccgacgaccgcgccacttaccgttcgctggcggtgccccggtggtccccaaggggaggggaagggggagggcgggggcgaggacagtgaccggaggtctctcagcggtgcttttctgcttggcagcctcagcggctggcgccaaaaccggactccgcccacttctcggcccctgctgggtg

50

aggggtgtggaatcctccagacgctgggggagggggagttgggagcttaaaaaactagtagccctttgggacca
ctttcagcagcgaactctcctgtacaccaggggtcagttccacagacgcgggccaggggtgggtcattgcggc
gtgaacaataattgactagaagttgattcgggtgttt

【 0 2 6 1 】

0.7UCOEfwd (配列番号2)

(配列番号2) Cgcaaacacccgaatcaacttctagtcaaattattgttcacgccgcaatgaccacccctgg
cccgcgtctgtggaactgaccctggtgtacaggagagttcgtcgtgaaagtgggtcccaaaggggtactagt
ttttaagctcccaactccccctccccagcgtctggaggattccacaccctcgcaccgcaggggcgagggaag
ggcgaggatccggttttggcgccagccgctgaggctgccaagcagaaaagccaccgctgaggagactccgg
tactgtcctcgccccgcctcccccttccctcccccttggggaccaccgggcccacgcccgcgaacggtaagt
ccgcggtcgtcggcgccctccgcccctccccctagggcccaattcccagcgggcccgcggcggccccctccc
cccgccgggcccgcgcccgcctcgtggccgcccggcgtggcggtgccaccctccccccag
cggccccgcgcccagctcccggctcccccttccggatgtggcttgagctgtaggcgggagggccggag
acgctgcagaccgcgaccggagcagctcggaggcgggtgaagtcgggtgctttccttctctctagctctcgc
tcgctggtggtgcttcagatgccacac

10

【 0 2 6 2 】

DHS4

(配列番号3) aattctatcatagtggtcttctctatgataactgcattgagaaagatgctctgcttgttgagt
gagcatttcacttcttctggttctgactatctgtctaatagtggtcatgtgggtgaaaagatagaaaagggga
gtagtattaggaagttcagtatgaggaagacttattagacttatgcataaacctaaattctgttgtaacttgaa
gagctgaagtgccacatatgcatctgtttaggagagcaagaactacaaatttggcttcagtttgcttgccttac
atcctgagaactctgtaggccacatgctcgtgaatatagcagcctctgcaacagtgaaagccagaaaaggaagt
ggaaagtctcaggggagggggcttctgtcatggatttatgagcacagcaagactaacaagcaaaaagaaaa
atgtaaaaggatcttgttcgt

20

【 0 2 6 3 】

IE4-5

(配列番号4) acatctttgagcttcagtttctcatctgtaaataaggggaataatacatacttcttaaggctac
tgcaaagatcaaataagtaatacattgaagcacttgggacagagcctgctacatagtaagtgtcattaagt
ttagttatcattgttgttgttttaggccaaggttgttgtaaattaaatgagataatataaaaaggtatntagc
tcaatatctggcacatagcaataatgaaatagatgaccttcatcttctgcttccctgcttccctttcagttgaaag
acttggctaataataatttgaccaaccaacttgcattcaagggagtgacaaggctggtatagccagccagtg
agtatcagaatctaaatgtttattaagacaaagggctgtcatgcaataaccaaccataccattatcagctgcc
atccttctgcttctctagggcagccttccctgatgtcaactcaaccagttaatctctcagtcacttgacatgtggct
atatatacacacaaaatagtggtgcatgcatcctgtgctgcaagcatttacagtcagtttatctgaacacactgt
atggttgatgtgaaatgctgaaactgttcaagtttaggtcctcacaagcaaggaatatgaaatatttcttggg
aaatatttatccacaacaaagagatgtacagtgcttctgtatacagtgatttacagtttccatgtgcttttacat
gtatttacttcatttgatccttacaacaaccccagaggtagatgtggcatgaattaccattatctcctttgag
aagaagaaactgagcatcaaagaagcttgttggccttcttgccagaaatcaccagtttgtaaattggtaaaag
agggcttgaaaccaggttctctgactctgacttcaagcactctcatacatctatattaatttttggagctagg
tattttatacttaggattctaaatattgcataaccattgaatgccacaccacccttgattcagtgcaaaaaatgg
gacttttcttaataaatagagaaatggagggtgcctaaaattacaaaattgactagagagatagtgatagaact
gggaaactcttagtctaataatatttattctttatcatatgatggaataactaagctcaatggcagaatcttcagtc
gcaatggtgttcaggttatgtgaaactatctgaaggattcctgaactcttcatatctaggaatgtagcgtttaaaa
gctcttagaattttcactctttaggtcctcctgacttgtgcttcaattcatgcataaacttattttataaggtctc
cgtctgcccttggctggagataaacatttttgtttatccaacaaagggatattttattattaaattctgacttgt
atagaagagaaatgaagtgataatctatataaattaagtcttgattagtagacatatgggttattcacttggataat
atggagtaaaattttaattcatggctaattacctccacctccactacctagtgccctccccctaccaatattagcc
aaaataaatcaaatttggaaactacaacctacttcaaaaagggtaaggtatataataagcaatatcatcaagtc
aaatagtattttttaaccatgtacaaggcatcatgctaggtgttacgaagatgcatgaaatatataagatgtgg
ttccaaccctcacagagtttatagacatcacataataaattctgaagtcaaatataaattaatttaaaattatctg

30

40

50

ctgttcagcattgttcactagtgacagccaaacaatgtcatcttgttgaaaggcattggtagtaaaaactgtgtct
 gaaatacccctctttcaaagggttcgtaaattgatagtcagggacacgaacaagatccttttacatctttcttt
 ttgcttgttagtcttgcctgctcataaatccatgacagaaagccccctcccctgagactttccacttccctttctg
 gctttcactgttgacagaggctgctatattcacgacatgtggcctacagagttctcaggatgtaagcaagccaaa
 ctgaagaccaaatgttagtcttctcctaaacagatgcatatgtggcacttcagctcttcagattacaac
 agaatttaggtttatgcataagtctaataagtcttctcactgaacttccctaataactactccccctttctatcttt
 tcaaccacatgaccactattagacagatagtcagaaccagaaggaagtgaatgtcactcaacaagcaga
 gcatctttctcaatgcagttatcatagacaagacacactatgatagaattgggtgctgctatgtattctttttga
 【 0 2 6 4 】

BTKp

10

(配列番号 5) Tgcatttctaggagaatccctgggggaatcattgcagttggagcataatgtagggggccc
 ctgagaaaacctccaggcttcaagtacataccttagtctgctttaccggtttacaggactcaagagaaagggtg
 acattgagagttaatccctgaggccaaatctaaatggagaaagtcaacatccacagaaaatggggaagggc
 acaagtatttctgtgggcttatattccgacattttatctgtaggggaaaaatgctttcttagaaaatgactcagc
 acggggaagtcttgtctctacctctgtcttgtttgtctttgggggtcccttcaactcaagttcaactgtgtgtcc
 ctgagactcctctgccccggaggacaggagactcgaaaaacgctcttctggccagtctctttgctctgtgtct
 gccagccccagcatctctctcttctctgtaagccccctctccctgtgctgactgtcttcatagtactttaggat
 gttgtccctttacctctgggaggatagcttgatgacctgtctgctcaggccagccccatctagagtctcagtggc
 cccagtcatgttgagaaaggttcttcaaagatagactcaagatagtagtgcagaggtcccaagcaaatgaa
 gggcggggacagttgaggggggtggaatagggacggcaggggaaccagatagcatgctgctgagaagaa
 aaaaagacattggttaggtcaggaagcaaaaaagggaactgagtggctgtgaaaggggtggggttctca
 gactgtccttctctctggactgtaagaattagtctc

20

【 0 2 6 5 】

coBTK

(配列番号 6) atggccgctgtgatcctggagagcattttctgaagagggtcccagcagaaaaagaaaacct
 ctccccgaactttaagaaaagactgttctgctgacagtgacaagctgtcttactatgagtacgactttgagc
 ggggccgcccaggatcaaaaaaggggagcatcgatgtggagaagattacatgctggagaccgtggctccct
 gaaaagaatccacccccctgagaggcagatcccaagacggggcgaggagtctctgagatggagcagattag
 tatcattgagcgttccccctatcctttcagggtggtgtacgacgagggaccactgtatgtgttctcaccacaga
 ggagctgagaaagaggtggattcaccagctgaagaacgtgattagatacaatagcgatctgggtgcagaagta
 tcacccttgttttggatcgacgggcagtacctgtgctgttcccagacagctaagaacgctatgggatgccaga
 ttctggaaaatcggaacggatctctgaaaccagggagttcacaccgcaagaccaaaaagccccctgcctcaa
 caccgaggaggatcagatcctgaaaaagcctctgccacccgagcctgctgcagccccagtcagcacttccg
 aactgaaaaaggtggtggtctgtatgactacatgccatgaatgctaacgatctgcagctgagaaagggcga
 cgagtatttcttctggaagagtctaactctgccttgggtggaggccagagataagaacggacaggagggttac
 atcccatctaattatgtgaccgaggctgaggactctattgagatgtacgagtggatatagcaagcacatgacacg
 gtcccaggctgagcagctgctgaagcaggagggcaagagggagggtttatcgtgcgatcttagtaaggc
 cggcaatacactgtgtcagtgctcgttaagagcaccggagacccccagggcgatcagacactatgtggtg
 tgttccacacctcagctctcagtactatctggctgagaagcacctgtttagtacaatcccagagctgattaactac
 caccagcacaattctgccggcctgatcagcaggctgaagtatcccgtctcccagcagaacaaaaatgtcctt
 ctaccgctggactggggtacggcagttgggagattgatccaaaggacctgacattcctgaaggagctgggaa
 ctgggcagtttggcgtggtgaagtatggaaaatggagagggcagtagatgtggccatcaagatgatcaagg
 agggctcaatgagcagaggacgagttcatcagggaggctaaggctatgatgaacctgtcccacgagaaactgg
 tgcagctgtatggagtgtgaccaagcagcggccatttttatcattacagagtacatggctaattgggtgtctg
 ctgaaactatctgcgagatgagacacagattccagacacagcagctgctggaaatgtgcaaggatgtgtgtg
 aggctatggagtacctggagtctaagcagtttctgcaccgggacctggctgctcgcaattgcctggtgaacgat
 cagggcgtggtgaaggtagtgacttcggactgtcaaggatgtgctggatgacgagtacaccagctccgtgg
 gctctaagtttctgtgagatggtctccacccgagggtctgatgtatagcaagttctcctctaagagcagatct
 gggccttggcgtgctgatgtgggaaatctacagcctgggcaagatgccttacgagcgggttcacaaattccga
 gacagctgagcacatcgcccagggcctgcccctgtaccggccacatctggcctctgagaagggtgtacaccatc

30

40

50

atgtacagctgttggcagcagagaaggccgacgagagacccacattcaagatcctgctgtccaacattctagatg
tgatggacgaggagagctga

【 0 2 6 6 】

co2BTK

(配列番号 7) atggccgcccgtgatcctggaagcatcttctctgaagcggagccagcagaagaagaaaacc
agccccctgaacttcaagaagcggctgttctctgctgaccgtgcacaagctgtcctactacgagtacgacttcca
gcggggcagacggggcagcaagaagggcagcatcgacgtcgagaagatcacctgctggagaccgtggtg
cccgagaagaacccccctcccagcggcagatccccagacggggcgaggaaagcagcgagatggaacaga
tcagcatcatcgagcggttcccttaccattccaagtgggtgtacgacgagggccccctgtacgtgttcagcccc
accgaggaactgcggaagcgggtgattcaccagctgaagaacgtgatccggtacaacagcgacctggtgca
gaagtaccaccctgcttttgatcgacggccagctgctgtgacgaccagaccgccaagaacgctatgggc
tgccagattctggaaaaccggaacggcagcctgaagcccggcagcagccacagaaagaccaagaagcccc
gccccccacccccgaagaggaccagatcctgaagaagcctctgcctcccagcccggcgtgcacctgtgag
caccagcagctgaagaaagtgggtggcctgtacgactacatgcccataaacgccaacgacctgcagctgag
gaagggcgacgagctacttcatcctggaagaagcaacctgccctgggtggcggggcagggacaagaacggcc
aggaaggctacatccccagcaactacgtgaccgaggccgaggactccatcgagatgtacgagtggtacagca
agcatgaccagaagccaggccgaacagctgctgaagcaggaaggcaaagagggcggttcatcgctccg
gacagcagcaaggccggcaagtacaccgtgagcgtgttcgccaagagcaccggcgacccccagggcgtgat
ccggcactacgtggtgtgacgacccccagagccagctactacctggccgagaagcactgttcagcaccatc
cccagctgatcaactatcaccagcacaacagcgtggactgatttctcggtgaagtaccccggttcccagc
agaacaaaaacgccccagcacagccggcctgggctacggcagctgggagatcgacccaaggacctgacc
ttctgaaagagctgggcaccggccagttcggcgtggtgaagtacggcaagtggaggggcccagctacgacgtg
gcatcaagatgatcaaggaaggcagcatgagcagggacgagttcatcgaggaagccaaagtgatgatgaa
cctgagccacgagaagctgggtgacgctgtacggcgtgtgcaccaagcagcggccccatcttcatcatcaccga
gtacatggccaacggctgcctgctgaactacctgcccggagatgcccgcacaggttccagacacagcagctgct
cgaaatgtgcaaggacgtgtgagggctatggaatacctggaatccaagcagttcctgcaccgggacctggc
cgccagaaactgcctggtgaacgaccaggggggtggtgaaggtgtccgacttcggcctgagcagatacgtgct
ggacgacgagctacaccagcagcgtgggcagcaagttccccgtgcgggtggagccccctgaggtgctgatga
cagcaagttcagcagcaagagcgacatctgggccttcggcgtgctgatgtgggagatctacagcctgggcaa
gatgccctacgagcgggttccaacacagcagaccgcccagcagatcgcccagggcctgcccgtgtacagggc
cccacctggccagcagagaaggtgtacaccatcatgtacagctgctggcacgagaaggccgacgagaggccc
accttcaagatcctgctgtccaacatcctggacgtgatggacgaggaaagctga

10

20

30

【 0 2 6 7 】

図 9 2 に関連する配列 (前述していないもの) - 以下の構築物は、前述の配列を特定するプロセスの一部において、臨床遺伝子療法用ベクターの上位候補として試験したものである。

【 0 2 6 8 】

GFP

(配列番号 8) atggtgagcaagggcgaggagctgttaccgggggtggtgccatcctggtcgagctggac
ggcgacgtaaaccggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggggcgatgccacctacggcaagctgac
cctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccacctcgtgaccacctgacctacggc
gtgacgtgcttaccgctacccccaccacatgaagcagcagcacttcttcaagtccgcatgcccgaaggct
acgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgcccaggtgaagttcgagg
ggcagaccctgggtgaaccgcatcgagctgaagggcagcacttcaaggaggacggcaacatcctggggcac
aagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtg
aacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgcgaccactaccagcagaacaccccc
atcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagctccgcccgtgagcaaaagacccc
aacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcggtatggacgag
ctgtacaagtaa

40

【 0 2 6 9 】

50

イントロン4

(配列番号9) ctcaaaaagaatacatagcagcaccaattctatcatagtggtgcttctgctatgataactgcat
 tgagaaagatgctctgcttgttgagtgagcatttcacttccttctggttctgactatctgtctaataagtggtcatgt
 gggtgaaaagatagaaaaggggagtagtattaggaagttcagtatgaggaagacttattagacttatgcata
 aacctaaattctgttgtaattctggaagagctgaagtgccacatatgcatctgtttaggagagcaagaactaca
 atttggcttctcagtttgcttgccttacatcctgagaactctgtaggccacatgctggaatatagcagcctctgca
 acagtgaaagccagaaaaggaagtggaaagtctcaggggaggggcttctgtcatggatttatgagcacag
 caagactaacaagcaaaaagaaaaatgtaaaaggatcttgttcgtgtccctgactatatcaaatttacgaaacc
 tttgaaagaggggtatttcagacacagttttactaccaatgcctttcaacaagatgacattgtttggctgacta
 gtgaacaatgctgaacagcagataattttaataatatttatattgacttcagaatttattatgtgatgtctataaa
 ctctgtgaggggttgaaccacatcttatatatttcatgcatcttcgtaaacctagcatgatgccttgatcatggt
 taaaaaataactatttgacttgatgatattgcttattatataccttacccttttgaagtagggtttagttccaat
 ttgatttattttggctaatttgggtgaggggagggcactaggtagtgagggtggaggttaattagccatgaatta
 aaattttactccatattatccaagtgaataacccatagtgactaatcaagacttaatttatatagattatcacttca
 tttctctctatacaaaagtcagaatttaataataagataaaaatacccttggttggataaacaanaaatgttatctcc
 agcaagggcagacggagaccttataaataagtttatgcatgaattgaagcacaagtcaggaggacctaaga
 gtatgaaaaattctaagagcttttaaacgctacattcctagatatgaagagttcaggaatccttcagatagttca
 cataacctgaacacattgctgactgaagattctgcc

10

【 0 2 7 0 】

イントロン5

(配列番号10) Ccatcatatgaataaaaagataaaaatattagactaagagtttcccagttctatcactatctct
 ctagtgcattttgtaatttttaggcacctccatttctctatttattaagaaaagtcctatttttgcactgaataca
 aggggtggtggtgattcaatggttatgcaatatttagaatcctaagtataaaaatacctagctccaaaaaattaa
 tagatgatgatgagagtgcttgaagtcagagtcagagaacctggttcaagccctcttttaccatttacaact
 gggtgatttctggcaagaaggccaacaagcttctttagtgcctcagtttcttctcaaggagaataatggtaa
 ttcattgccacatctacctctggggttgttgaaggatcaaatgaagtaataacatgtaaaagcacatggaaa
 actgtaaatacactgtatacgaagcactgtacatctcttgttggataaatatttccaaggaatatttcata
 ttccttgccttgtgaggacctaaacttgaacagtttcagcatttcacatcaaccatacagtgtgttcagataaact
 tgactgtaaatacttgcagcacaggatgcatgcacacatatttgtgtgtatataatagccacatgcaagtgactg
 agagattaactgggtgagttgacatcaggaaaggctgcctagagaaacaggaaggatggcagactgataatg
 gtatgggtgggttattgcatgacagcccttctttaaataaacatttagattctgatactcactggctggctatac
 cagcctgtacactcccttgaatgcaagtttgggtgggtcaaaattatattagccaagctttcaaacgtgaaagg
 aacaggaggaacgaagatgaaggatcatctattcaattatgctatgtgccagatattgagctaaatacctttta
 tatattatctatttaattttcacaacaaccttggcctaaaaacaacaacaatgataactaaccttaatgagcac
 ttactatgtagcaggctctgtcccaagtgcttcaaatgtattacttatttgatcttgcagtagccttaagaagat
 gtattattcccctatttacagatgaggaaactgaagctcaagatgt

20

30

【 0 2 7 1 】

イントロン13

(配列番号11) ggtaggggtggactggccagttgcaaaaactacctttgctggccttgccttagggagtgtc
 cttgagggtacactgttctgcagcagctgcctcaaggacgctcaagacagatccaagcaaaagttattcactgat
 tttcttctctagtggctacgactgggactgcaaaaacatagattcataaagggttctgtgcttcttgggtctt
 tttgtcttttatttttaattgtgggaaaaatttcagtaactatccctgagttcattaactaccatcactaacataatca
 taaagggtttgggaggttgccttagtctatcttcttgccttatggccaccttgaacctaaaattcccagattcct
 ctaaccaatgaatcccgttctgagattgacttaagcaagacagattagtagtcttaaaaaatttcccctttacta
 gttttcctatttctaccccagtagggattttgtctattgtaagaattatacattcatgaccccaagaatcacacc
 aagacttta

40

【 0 2 7 2 】

1 kb

【 0 2 7 3 】

CONTIG

50

(配列番号 14) tcaaaaagaatacatagcagcaccaattctatcatagtgtgtcttctatgataactgcat
 tgagaaagatgctctgctgttgaggagcattcacttccttctggttctgactatctgtctaatagtggatcatgt
 gggttgaaaagatagaaaaggggagtagtattaggaagttcagatagaggaagacttattagacttatgcata
 aacctaaattctgttgtaattctggaagagctgaagtgccacatatgcatctgtttaggagagcaagaactaca
 atttggcttcagtttggttgccttacatcctgagaactctgttaggccacatgtcgtgaatatagcagcctctgca
 acagtgaagccagaaaaggaagtggaaagtctcaggggaggggcttctgtcatggattatgagcacag
 caagactaacaagcaaaaagaaaatgtaaaggatcttgttcgtgtccctgactatatcaaatttacgaaacc
 tttgaaagaggggtatttcagacacagttttactaccaatgcctttcaacaagatgacattgtttggctgacta
 gtgaacaatgctgaacagcagataattttaattaatttatattgacttcagaattattatgtgatgtctataaa
 ctctgtgaggggttgaaccacatcttatataatttcagatcattctgtaaacacctagcatgatgcctgtacatggt
 taaaaaataactatttgacttgatgatattgcttattatataccttaccctttttgaagtaggtttgtagttccaaat
 ttgattttttggctaattttggtgaggggaggccactaggtagtgagggtggaggttaattagccatgaatta
 aaattttactccatattatccaagtgaataaccataatgfactaatacaagacttaatttatatagattatcacttca
 tttctctctatacaaaagtcagaatttaataataagataaaaataccctttgttggataaacaanaaatgttatctcc
 agcaagggcagacggagaccttataaaataagtttatgcatgaattgaagcacaagtcaggaggacctaaaga
 gtatgaaaaattctaagagcttttaaacgctacattcctagatatgaagagttcaggaatccttcagatagttca
 cataacctgaacaccattgctgactgaagattctgccattgagcttagtattccatcatatgaataaaagataaa
 atatttagactaagagtttcccagttctatcactatctctctagtgcaattttgtaattttaggcacctccatttctct
 atttattaagaaaagtccattttttgcactgaatacaaggggtggtgtggcattcaatggttatgcaatatttaga
 atcctaagtataaaatacctagctccaaaaaattaaatagatgatgatgagagtgcttgaagtcagagtcaga
 gaacctggtttcaagccctctttaccatttacaactgggtgatttctggcaagaaggccaacaagctctttg
 atgctcagtttcttctcaagggagaataatggtaattcatgccacatctacctctgggggttgttgaaggatc
 aatgaagtaataatacatgtaaaagcacatggaaaactgtaaatcactgtatacgaagcactgtacatctct
 ttgttgggataaataatttccaaggaatatttcatattccttgccttggtaggacctaaacttgaacagtttcag
 catttcacatcaaccatacagtggttccagataaaacttgactgtaaatgcttgcagcacaggatgcatgcacac
 atatttgtgtgtatatatagccacatgtcaagtgactgagagattaactggttgagttgacatcaggaaaggctg
 cctagagaaacaggaaggatggcagactgataatggatgggttgggttattgcatgacagccctttgtctta
 aacatttagattctgatactcactggctggctataccagccttctacactcccttgaatgcaagtttgggtggct
 aaaattatattagccaagtcttcaaacgaaaggggaacaggaggaacgaagatgaaggatcatctattcaatt
 attgctatgtccagatattgagctaaataccttttatataattatctcatttaattttcacaacaaccttggcctaa
 aaacaacaacaatgataactaacacttaatgagcacttactatgtagcaggctctgtcccaagtgttcaaatg
 tattacttatttgatctttgcagtagccttaagaagtatgtatttcccctatttacagatgaggaaactgaagct
 caaagatgttatccttatttctctggggtaggggtgactggccagttgcaaaaactacctttgctggccttgcc
 tagggagtgctttaggtacactgttctgcagcagctgcctcaaggacgctcaagacagatccaagcaaaaag
 ttattcactgattttcttctctagtggttacgactgggactgcaaaaacatagattcataaagggttctgtgt
 gtcttgggtctttttgtcttttatttttaattgtgggaaaattttcagtactatccctgagttcattaactaccatca
 ctaacataatcataaagggtttggggaggttgccttagtctatcttcttgccttatggccaccttgaacctaaaat
 tcccagattcctctaaccaatgaatcccgtttctgagattgacttaagcaagacagattagtagtcttaaaaat
 ttcccttttactagttttcctatttctaccccagtagggattttgtctattgtaagaattatacattcatgaccca
 aagaatcacaccaagacttta

10

20

30

40

【 0 2 7 4 】
 revCONTIG

(配列番号 15) taacaataaagtcttgggtgtgattccttgggggtcatgaatgtataattcttacaatagacaa
 aatccctactggggtagaaataggaaaactagtaaaagggaaatttttagaagtactaatctgtctttgtcttaa
 gtcaatctcagaaacgggattcattggttagaggaatctgggaattttaggttcaaggtggccataaggcaag
 aagatagactaagcaacctccccaaatccctttatgattatgtagtgatggtagttaatgaactcagggatagt
 actgaaaatttcccacaattaaaaataaaagacaaaaagaccaagacaacgacaaagccctttatgaatct
 atgtttttgcagtcccagtcgtagccactagaggaagaaaatcagtgaataacttttgccttggatctgtctttag
 cgtccttgaggcagctgctgcagaacagtgtagctcaaggacactccctaaggcaaggccagcaaaaggtagtt
 tttgcaactggccagtcacccctaccccagagaaataaggataacatctttgagcttcagtttctcatctgtaa

50

ataggggaataatacatacttcttaaggctactgcaaagatcaaataagtaatacatttgaagcacttgggaca
gagcctgctacatagtaagtgtcattaagtgttagttatcattgttgtgttttaggccagggtgtgtgaaa
atfaaatgagataatataaaaaggatatttagctcaatatctggcacatagcaataattgaatagatgatccttc
atcttcggttccctggttccctttcagtttgaaagacttggctaataatatttgaccaaccaaacttgcattcaag
ggagtgtacaaggctggtatagccagccagtgagtatcagaatctaaatgtttattaagacaaagggctgtcat
gcaataacccaaccataccattatcagctcgtccatccttctggttctctagggagcctttctgatgtcaactca
accagttaatctctcagtcacttgacatgtggctatatatacacacaaaatgtgtgcatgcatcctgtgtgca
agcatttacagtcaagtttatctgaacacactgtatgggtgatgtgaaatgctgaaactgttcaagtttaggtcct
cacaagcaaggaatatgaaatatttcccttgggaaatatttatccacaacaaagagatgtacagtgctttcgtat
acagtgatttacagtttccatgtgcttttcatgtatttacttctttgatccttacaacaacccagaggtag 10
atgtggcatgaattaccattatttctcctttgagaagaagaaactgagcatcaaagaagcttgttggccttcttgc
cagaaatcaccagtttgaatggtaaaagagggcttgaaccaggttctctgactctgacttcaagcactct
catacatcatctatttaatttttggagctaggtattttatacttaggattctaaatattgcataaccattgaatgcc
acaccacctgtattcagtgcaaaaaatgggacttttcttaataaatagagaaatggaggtgcctaaaattac
aaaattgcactagagagatagtgatagaactgggaaactcttagtctaataattttatcttttattcatatgatgga
atactaagctcaatggcagaatcttcagtcagcaatgggtttcaggttatgtgaactatctgaaggattcctgaa
ctcttcatactaggaatgtagcgtttaaagctcttagaattttcatactcttaggtcctcctgacttgtgcttc
aattcatgcataaacttattttataaggtctccgtctgcccttgcctggagataacattttgtttatccaacaaagg
gtattttatcttattataaattctgactttgtatagaagagaaatgaagtataatctataaattaagtcttga
ttagtacatatgggttattcacttggataaatggagtaaaatttcaattcatggctaattacctccacctccacta 20
cctagtggtcctcccctcaccaatattagccaaaataaatcaatttgaactacaacacttcaaaaaggg
aaggtatataataagcaatatcatcaagtcaaatagatatttttaacctgtacaaggcatcatgctaggtgta
cgaagatgcatgaaatataagatgtggttccaacctcacagagtttatagacatcacataataaattctga
agtcaaatataaattaatttaaaattatctgctgttcagcattgttccactagtgagccaaacaatgtcatctgtt
gaaaggcattggtagtaaaaactgtgtctgaaatacccctcttcaagggttctgtaaatttgatatagtcaggg
acacgaacaagatccttttacattttcttttgcctttagtcttgcctgctcataaatccatgacagaaagccc
cctcccctgagactttccacttcttttctggcttctactgttgcagaggctgctatattcacgacatgtggccta
cagagttctcaggatgtaagcaagccaaactgaagaccaaattttagtcttctcctaaacagatgcata
tgtggcacttcagctcttccagattacaacagaatattagggttatgcataagtctaataagtcttctcactga
acttcttaataactactcccctttctatcttttcaaccacatgaccactattagacagatagtcagaaccagaag 30
gaagtgaaatgctcactcaacaagcagagcatcttctcaatgcagttatcatagacaagacacactatgatag
aattgggtgctgctatgtattcttttga

【 0 2 7 5 】

ABCD

【 0 2 7 6 】

(配列番号 16) ctggggtatggcaggggctgggcagcagcagcaatgtaccttgccttgggaccctaaaa
accagagagacagcatggctggtgccatttatcagctagtgaggaggctgacggagggtgggagtgctatc
agcacaaggccctggcagctcccttctggtgattagagaggccgaaagggctcctttccgacaagggtgaggg
tgggcggaacaggaagagaaaaatgtgacatgaggtgaccatccgaacaggtagcaaatgttagaaagggg
tacctctggcaaaccttagtgaaaagtaatatggcagggagcagtcagataaaaaacaagcccttctgtcaata 40
gtgcttgaagactcaatagggatacatgggtcaatgaagcctttagaaaaagaataactaagaggcagattct
ctgagaacatggtaaaagctcacgctccacgttatgaagttgaccttctgtgagctagggaaaggcctggctag
gccaggggtgtaggctacctgccttgagctgtaccaggccaaatgtcggcagggctcagagctggcttattaag
gactgtgtggaagctgtgccaacctcgtggtaacaatgggtaaaagactgggcccaggagaaagcagcctctg
cctcagcccagacagtgccgccaaccttgaggttgggcaaaggttctccttaccattgccctccatgtg
catggcttgcctttcttcttcttattttctccttctccttctcggatccacgcgtgaattctttgaaactcct
tatgggtgcaactaatgtaactttccatccagttatgggggattgggtgcaattttaaattatcactatgatttgc
atttccatttgagcaaatctctatagagtttcttctcagtgactagaccatatacaggaagtgacttaggtata
aaggggaagatacagctttcgaaaaccaaagtttgggcgttctccaagagttatcagatacccccttctacacc
cacaatgatctgattgctgagatctgattgctaactactgaaaataaggaagaactagaattttcagtgacaca 50

gtgctcagcaagaagctagaaaagaggccttgacatatttgactccaaagctacttggttatgcatgaagccat
ctggggaggggaaggaggaggagaactcctctgaggacctgaaacaattgggccacgtgtgactttcagt
ttctatggagattcatgtgcagtggtgagggaatctgagagcattggaaccagaagctttaacgcgta
ggaaagacaggggaatggccagaatcttctagccaattgagtagtgcttcaaggagaaatcaagagaaaac
actacttcttgatattttggctaagtagtcatttgaagtacagttgactggttatttattttaaatcataatctcat
agactcttccaatcataggctggctgtgtagtttctgaattttgctctggtattcttcttcttttttttttttt
tatt
tatt
gagtcaagcgattctcctgcctcagcctcctgagttgctgggactacagggcctgtcaccacgcccggctaa
ttttttgtattttaatagagacgggatttcacatggtggccaggctggctcctaactcctgacctcaagtgatcc
gccagcctcagcctcccaaagtgctgggattacgggcatgagccactgcgcctggacttattattcttaatagt
atcttcttatgagcgaagataagagcccaagatggtttagttactgattctgcaagtgctatttctattaattc
cttggcactactgcagtttgtatgatggctgcactcttgttaataagcttcgtctttctgaattctgttgcctcatag
ggagctgggaggctgcaaaaggtggccctgtaaaaatctttgcattataatttaataattacagaccccgatg
ggacaatggttgaaaaattatattcaccgtctaggaattgggaactgaaagtccaatatctgcctcagtgagg
ttctggcacctgcattatcccttctgggtatatcaagatcaacagctgcacagatacttttgcttttcacagattct
acacatatcatataaaggtagtgaagctacctctacaccttaccaagcacacagg

10

【 0 2 7 7 】

DCBA

(配列番号 17) cctgtgtgcttggaaggtgtagaggtagctttacactattcacctttatatgatatgtgta
gaatctgtgaaaagcaaaagtatctgtgcagctgttgatcttgatataaccagaagggataatgcaggtgcc
gaactccactgaggcagatattggactttcagttccaatttcttagacggtgaatataattttcaaacattgtc
ccactggggtctgtaattattaatataaatgcaaagatttttacagggccaccttttgagcctcccagctcc
ctatggagcaacagaattcagaaagacgaagcttattaacaagagtgagccatcatacaaaactgcagtatgc
caaggaattaatagaaatagcacttgcagaatcagtaactaaacacatcttgggctcttatcttcgctcataaga
taaaatactattaagaataataagtccaggcgcagtggtcatgcccgtaatcccagcactttgggaggctga
ggctggcggatcacttgaggctcaggagttagagaccagcctggccaacatggtgaaatcccgtctctattaaa
atacaaaaaattagccgggctgggtgacagggcctgtagtcacagcaactcaggaggctgaggcaggaga
atcgcttgaactcgggaggcggagggtgcagtgagccaagatcgtgacactgcactccagcctggagtctcaa
aaaaaaaaataaaaaataaaaaataaaaaaagaagaagaataaccagagcaaaatcagaaaactacac
agccagcctatgatgggaagagtctatgagatagatttaaaaaataaaataaccagtcaactgtacttcaaatg
actacttagccaaaatatccaagaagtagtgtttctcttgattctccttgaaagcactactcaattggctagga
agattctggccattcccgtctttcctacgcgtttaaagcttctgggtttccaatgctctcagattgccctcagcc
actgcaatgaatcctcatagaaactgaaagtacacagctggccaattgtttcagggctcctcagaggagttctc
cctcctcctcccctcccagatggcttcatgcataaccaagtagctttggagtcaaatatgtcaaggcctcttt
ctagcttcttctgagcactgtgtcactgaaaattctagttcttcttattttcagtagttagcaatcagatctcag
caatcagatcattgtgggtgtagaagggggtatctgataactcttggagaacgcccaaacctttggttttcgaa
agctgtatcttccccttatacctaagtcacttctgatatgggtctagtcactgaaaggaaactctataggaat
ttgctcaaatggaaatagcaaatcatagtgataattaaaattgcaccaatccccataactggatggaaagtt
acattagttcgcaccataaggagtttacaagaattcacgcgtggatccgaggaaaggaaaggagaataat
gaagacaagagaaaagcaagccatgcacatggagggcaatggtaagaggagaaacctttgccacaacctca
agggttggccgactgtctgggctgaggcagaggctgttctcctggcccagcttttaccattggtaccacg
aggttggcacagcttccacacagctcttaataagccagctctgacctggcgacatttggcctggtacagctc
aaggcaggtagcctacacctggcctagccaggcctttccctagctcacaagggtcaacttataacgtggag
cgtgagctttaccatgttctcagagaatctgcctcttagtatttcttttctaaaggctcattgacctatgtatc
cctattgagcttcaagcactatttgacagaagggtgtttttatctgactgctccctgcaatattactttccac
taagtttggcagaggtagcccttctaacattttgctacctgttcggatggtcacctcatgtcacattttctctcc
tgttccgcccacctcagccctgtcggaaaggacctttcggcctctctaataccagaaagggactgccagg
gccttgtgctgatgacactcccacctccgtcagcctcctccactagctgataaatggcaccagccatgctgtct
ctctggtttttaggggtccaagcaaggtacattgtgctgctgcccagcccctgccataccccag

20

30

40

【 0 2 7 8 】

50

AB

(配列番号 18) ctggggatggcaggggctgggcagcagcagcaatgtaccttgcttgggaccctaaaa
accagagagacagcatggctggtgccatttatcagctagtgaggaggctgacggagggtgggagtgtcatc
agcacaaggccctggcagtccttctggtgattagagaggccgaaagggtcctttccgacaagggtgaggg
tggcggaacaggaagagaaaaatgtgacatgaggtgaccatccgaacaggtagcaaatgttagaaagggg
tacctctggcaaaccttagtgaaaagtaatatgacgggagcagtcagataaaaaacaagcccttctgtcaata
gtgcttgaagactcaataggatacatgggtcaatgaagcctttagaaaaagaataactaagaggcagattct
ctgagaacatggtaaaagctcacgctccacgttatgaagttgaccttctgtgagctagggaaaggcctggctag
gccagggtgtaggctacctgccttgagctgtaccaggccaaatgtcgccagggtcagagctggcttattaag
gactgtgtggaagctgtgccaacctcgtggttaacaatgggtaaaagactgggccaggagaaagcagcctctg
cctcagcccagacagtgccgccaaccttgaggttgggcaaaaggttctcctcttaccattgccctccatgtg
catggcttgcttttcttcttcttattttctccttctcctcggatccacgcgtgaattcttgtaaactcct
tatgggtgcaactaatgtaactttccatccagttatgggggattgggtgcaattttaattatcactatgatttgc
atttccatttgagcaaatcctatagagtttcttctcagtgacttagaccatatacaggaagtgacttaggtata
aaggaagatacagctttcgaaaaccaagttgggcgcttccaaagagttatcagatacccccttctacacc
cacaatgatctgattgctgagatctgattgctaactactgaaaaaaggaagaactagaatcttctcagtgacaca
gtgctcagcaagaagctagaaaagaggccttgacatattgactccaagctacttggttatgcatgaagccat
ctggggaggggaaggaggaggagaactcctctgaggacctgaaacaattgggccacgtgtgactttcag
ttctatggagattcatgtgcagtggtgagggcaatctgagagcattggaaccagaagctttaa

10

【 0 2 7 9 】

20

A

(配列番号 19) ctggggatggcaggggctgggcagcagcagcaatgtaccttgcttgggaccctaaaa
accagagagacagcatggctggtgccatttatcagctagtgaggaggctgacggagggtgggagtgtcatc
agcacaaggccctggcagtccttctggtgattagagaggccgaaagggtcctttccgacaagggtgaggg
tggcggaacaggaagagaaaaatgtgacatgaggtgaccatccgaacaggtagcaaatgttagaaagggg
tacctctggcaaaccttagtgaaaagtaatatgacgggagcagtcagataaaaaacaagcccttctgtcaata
gtgcttgaagactcaataggatacatgggtcaatgaagcctttagaaaaagaataactaagaggcagattct
ctgagaacatggtaaaagctcacgctccacgttatgaagttgaccttctgtgagctagggaaaggcctggctag
gccagggtgtaggctacctgccttgagctgtaccaggccaaatgtcgccagggtcagagctggcttattaag
gactgtgtggaagctgtgccaacctcgtggttaacaatgggtaaaagactgggccaggagaaagcagcctctg
cctcagcccagacagtgccgccaaccttgaggttgggcaaaaggttctcctcttaccattgccctccatgtg
catggcttgcttttcttcttcttattttctccttctccttctc

30

【 0 2 8 0 】

B

(配列番号 20) gaattcttgtaaactccttatgggtgcaactaatgtaactttccatccagttatgggggat
tggtgcaattttaattatcactatgatttgctatttccatttgagcaaatcctatagagtttcttctcagtgga
tagaccatatacaggaagtgacttaggtataaaggggaagatacagcttccgaaaaccaagtttgggcttctc
caaagagttatcagatacccccttctacaccacaatgatctgattgctgagatctgattgctaactactgaaaa
taaggaagaactagaatcttctcagtgacacagtgctcagcaagaagctagaaaagaggccttgacatattgac
tccaaagctacttggttatgcatgaagccatctggggaggggaaggaggaggagaactcctctgaggacc
tgaacaattgggccacgtgtgactttcagtttctatggagattcatgtgcagtggtgagggcaatctgagag
cattggaaccagaagctttaa

40

【 0 2 8 1 】

BTKe

(配列番号 21) tccatcacctactagatatatcagtgcagtgaaaacttcgctaaactaacgctatacctat
atcatgaagtgtgtggactagagacaagtgcataatccttacggcaattaactgggaaacgtcaaatagtaacta
ccactcaccttttccgaaaaatcggcttagtttggccaccatagccactctgcttctgtcataacgccgcttct
ctgggaaaacgaattggattttgtataaaaactgaagatcagcaagtaagtcttacaggtttatcttaatttc
gcagcagaaatattaacgctcaagccaggcgtggaggaggagagaccggactcgtatgttattctacaaca
caaatgtcacattaacaccaaattatgcggaatccatcttaccctgggcgtacagagaatccttggccttctgt

50

actgtgtcactttatgggggttggtgcttgccacacttcttacagaaagtccggcgggttttagggacgttaacct
 agtaaagaacagttcagaacgtgcaatgttatttgaccacaatggcacaacgccctaccttaccagctaaa
 gctgaggcactccaggaggactcctcattacttgctacctctgactacaggggtggccagccccatgtgcttca
 agcagagcttctcctccgctcgagcccaaaagaggggaagagacctcattaactccacccccggctaactcta
 cctctttgaaccatcacttcaattcctggccccgtagccccggtccctttagggttgatcccggcaagattgggt
 tgctctgatataatcgagtccacacaggagcctggacccatcccggcatagcacgggacgaaggggggaa
 agattaagctggatgttactcggccccaccagcaagtcctaccatgcttgcgtgagcgtatcggcgcggaa
 agaaagaaaccgagggcaaacggaagtataataggaggttcccgatcgcacttctcatgggagtcggtagg
 agcaatcatagagtgtaggctcagcgcagcgcctcgggcggtgagaggactcagttcggagccgcggg
 cgggagcttaaggaaggactccgcctaaaggggtggtccactcaccocgacttctcccgcggcagcttca
 acgtttcgtcactttatctcttttggtggactctgctacgtagtggcggttcagtgaaggagcagtgttttccca
 gatcctctggcctccccgtaggggaagccaggactagggtcgaatgaaggggtcctccacctccacgtt
 ccattcctgttccacctcaaggctcactgggaacacctttcgcagcaaactgctaattcaatgaagacctggagg
 gagccaattgttccagttcatctatcacatggccagttggtccattcaacaaatggttattggatgccattatgt
 ggcaggcactgttccgggggagaggtacagtaatctaataaggcttataaatgtgcaattatgaactaagtactt
 tgaagaaaaggaacaatgattggcattaaagcagcacccttctgttgaggagtaagtcagcagctctaggtt
 ctgaaaagtgacaatgaaattggttgctcctgt

【 0 2 8 2 】

BTKe Myc

(配列番号 22) tgttactcggccccaccagcaagtcctaccatgcttgcgtgagcgtatcggcgcggaa
 agaaagaaaccgagggcaaacggaagtataataggaggttcccgatcgcacttctcatgggagtcggtagg
 agcaatcatagagtgtaggctcagcgcagcgcctcgggcggtgagaggactcagttcggagccgcggg
 cgggagcttaaggaaggactccgcctaaaggggtggtccactcaccocgacttctcccgcggcagcttca
 acgtttcgtcactttatctcttttggtggactctgctacgtagtggcggttcagtgaaggagcagtgttttccca
 gatcctctggcctccccgtaggggaagccaggactagggtcgaatgaaggggtcctccacctccacgtt
 ccattcctgttccacctcaaggctcactgggaacacctttcgcagcaaactgctaattcaatgaagacctggagg
 gagccaattgttccagttcatctatcacatggccagttggtccattcaacaaatggttattggatgccattatgt
 ggcaggcactgttccgggggagaggtacagtaatctaataaggcttataaatgtgcaattatgaactaagtactt
 tgaagaaaaggaacaatgattggcattaaagcagcacccttctgttgaggagtaagtcagcagctctaggtt
 ctgaaaagtgacaatgaaattggttgctcctgt

【 0 2 8 3 】

以下の遺伝子発現カセットの配列は、pRRLSIN.cppt.PGK-GFP.WPRE [PGK-GFPを除
去] (Addgene #12252) のpRRLバックボーンにクローニングする。

【 0 2 8 4 】

GFP配列を有するプロモーターを含む核酸を以下に示す (BTKp.GFP) 。

【 0 2 8 5 】

(配列番号 23)

gcatttctaggagaatccctgggggaatcattgcagttggagcataatgtagggggccccctgagaaaacc
 tccaggctcaagtgacatacctagtctgctttaccggtttacaggactcaagagaaaggtggacattgagagt
 taatccctgaggccaaatcttaaatggagaaagtcaacatccacagaaaatggggaagggcacaagttttct
 gtgggcttatattccgacattttatctgtaggggaaaaatgctttcttagaaaatgactcagcacggggaagtc
 ttgtctctacctctgtcttgtttgtcctttgggggtcccttactatcaagttcaactgtgtgtccttgagactcctc
 tgccccggaggacaggagactcgaaaaacgcttctcctggccagctctttgctctgtgtctgccagccccag
 catctctcctcttctcgtgaagcccctctccctgtgctgactgtcttcatagtactttaggtatgttgcctttacc
 tctgggaggatagcttgatgacctgtctgctcaggccagccccatctagagtctcagtggtcccccagtcattg
 agaaaggttcttcaaagatagactcaagatagtagtgtcagaggtcccaagcaaatgaagggcggggacag
 ttgaggggggtggaatagggacggcagcaggggaaccagatagcatgctgctgagaagaaaaaaagacattgg
 tttaggtcaggaagcaaaaaaaggggaactgagtggtgtgaaaggggtggggttctcagactgtccttctc
 tctggactgtaagaattagtctcgaggccaccatgggtgagcaagggcgaggagctgttccacgggggtggtgc
 ccatcctggctcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgat

10

20

30

40

50

gccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccacctcg
 tgaccacctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaa
 gtccgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagaccg
 cgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggagg
 acggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagc
 agaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgac
 cactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccag
 tccgccctgagcaaagaccccacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccggg
 atcactctcgcatggacgagctgtacaagtaa

INT4.BTKp.GFP (配列番号24)

10

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
 CCTCAAAAAGAATACATAGCAGCACCAATTCTATCATAGTGTGTCTTGTCTATGATAAC
 TGCAATTGAGAAAGATGCTCTGCTTGTGAGTGAGCATTTCACTTCTTCTGTTTCTGAC
 TATCTGTCTAATAGTGGTCATGTGGGTTGAAAAGATAGAAAAGGGGAGTAGTATTAGGA
 AGTTCAGTATGAGGAAGACTTATTAGACTTATGCATAAACCTAAATTCTGTTGTAATCT
 GGAAGAGCTGAAGTGCCACATATGCATCTGTTTAGGAGAGCAAGAACTACAAATTTGGT
 CTTCAGTTTGGCTTGTACATCCTGAGAACTCTGTAGGCCACATGTCGTGAATATAGC
 AGCCTCTGCAACAGTGAAAGCCAGAAAAGGAAGTGGAAAGTCTCAGGGGAGGGGGCTTT
 CTGTCATGGATTTATGAGCACAGCAAGACTAACAAAGCAAAAAGAAAATGTAAAAGGAT

20

CTTGTTTCGTGTCCCTGACTATATCAAATTTACGAAACCTTTGAAAGAGGGGTATTTTCA
 ACACAGTTTTTACTACCAATGCCTTTCAACAAGATGACATTGTTTGGCTGCACTAGTGA
 ACAATGCTGAACAGCAGATAATTTTAAATTAATTTATATTTGACTTCAGAATTTATTAT
 GTGATGTCTATAAACTCTGTGAGGGTTGGAACACATCTTATATATTTTCAATGCATCTTC
 GTAACACCTAGCATGATGCCTTGTACATGGTTAAAAAATACTATTTGACTTGATGATA
 TTGCTTATTATATACCTTACCCTTTTTGAAGTAGGTTTGTAGTTCCAAATTTGATTTATT
 TTGGCTAATATTGGTGAGGGGAGGCCACTAGGTAGTGGAGGTGGAGGTAATTAGCCATG
 AATTAATAATTTTACTCCATATTATCCAAGTGAATAACCCATATGTACTAATCAAGACTT
 AATTTATATAGATTATCACTTCAATTTCTTCTTATACAAAGTCAGAATTTAATAATAAG
 ATAAAATACCCTTTGTTGGATAAACAAAATGTTATCTCCAGCAAGGGCAGACGGGAGAC

30

CTTATAAAATAAGTTTATGCATGAATTGAAGCACAAGTCAGGAGGACCTAAGAGTATGA
 AAAATTCTAAGAGCTTTTAAACGCTACATTCCTAGATATGAAGAGTTCAGGAATCCTTC
 AGATAGTTCACATAACCTGAACACCATTGCTGACTGAAGATTCTGCCGGGCCCTGAGA
 AAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGA
 GAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACA
 TCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTTA
 TCTGTAGGGGAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTA
 CCTCTGTCTTGTGTTTGTCCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTG
 AGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTT
 TGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAGCCCTCTCCCTGTG
 CTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTG

40

ATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAG
 AAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAG
 GCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGAAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCT
 GCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGAGTG
 GCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGT
 CTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCT
 GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGG
 GCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCC
 GTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTACGCCGCTA
 CCCCAGCCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC

50

AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG
 TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA
 CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCA
 TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
 GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCC
 CGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
 ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC
 GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

INT5.BTKp.GFP (配列番号25)

GCATTTCCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
 CCATCATATGAATAAAAGATAAAATATTAGACTAAGAGTTTCCCAGTTCTATCACTATC
 TCTCTAGTGCAATTTTGTAAATTTTAGGCACCTCCATTTCTCTATTTATTAAGAAAAGTCC
 CATTTTTTGCAGTGAATACAAGGGTGGTGTGGCATTCAATGGTTATGCAATATTTAGAA
 TCCTAAGTATAAAATACCTAGCTCCAAAAAATTAAATAGATGATGTATGAGAGTGCTTG
 AAGTCAGAGTCAGAGAACCTGGTTTCAAGCCCTCTTTTACCATTTACAAACTGGGTGAT
 TTCTGGCAAGAAGGCCAACAAGCTTCTTTGATGCTCAGTTTCTTCTTCTCAAAGGAGAA
 TAATGGTAATTCATGCCACATCTACCTCTGGGGTTGTTGTAAGGATCAAATGAAGTAAT
 AATACATGTAAAAGCACATGGAAAACCTGTAAATCACTGTATACGAAAGCACTGTACATC
 TCTTTGTTGTGGATAAATATTTCCCAAGGAAATATTTTCATATTCCTTGCTTTGTGAGGA
 CCTAAACTTGAACAGTTTTCAGCATTTTACATCAACCATACAGTGTGTTTACAGATAAACTT
 GACTGTAAATGCTTGCAGCACAGGATGCATGCACACATATTTGTGTGTATATATAGCCA
 CATGTCAAGTGACTGAGAGATTAACCTGGTTGAGTTGACATCAGGAAAGGCTGCCTAGAG
 AAACAGGAAGGATGGCAGACTGATAATGGTATGGTTGGGTATTGCATGACAGCCCTTT
 GTCTTAATAAACATTTAGATTCTGATACTCACTGGCTGGCTATACCAGCCTTGTACACT
 CCCTTGAATGCAAGTTTGGTTGGTCAAATATATTAGCCAAGTCTTTCAAACCTGAAAG
 GGAACAGGAGGAACGAAGATGAAGGATCATCTATTCAATTATTGCTATGTGCCAGATAT
 TGAGCTAAATACCTTTTATATATTATCTCATTTAATTTTACAACAACCTTGGCCTAAA
 AACAACAACAATGATAACTAACCTTAATGAGCACTTACTATGTAGCAGGCTCTGTCCC
 AAGTGCTTCAAATGTATTACTTATTTGATCTTTGCAGTAGCCTTAAGAAGTATGTATTA
 TTCCCCTATTTACAGATGAGGAAACTGAAGCTCAAAGATGTTAGGGCCCCTGAGAAAAC
 CTCCAGGCTTCAAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGTTTTACAGGACTCAAGAGAAA
 GGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCA
 CAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTG
 TAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTC
 TGTCTTGTGTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGAC
 TCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCCTGGCCAGTCTCTTTGCT
 CTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCTCTTTCCCTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGA
 CTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGA
 CCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAG
 GTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCAAGCAAATGAAGGGCG
 GGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGA
 GAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACCTGAGTGGCTGT
 GAAAGGGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTCCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGA
 GGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCCG
 AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT
 GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC
 CTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG
 ACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG
 CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGA
 GGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCA

10

20

30

40

50

ACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCC
 GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG
 CAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGC
 TGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG
 AAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCAT
 GGACGAGCTGTACAAGTAA

INT13.BTKp.GFP (配列番号26)

GCATTTCCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
 CGGTAGGGTGGACTGGCCAGTTGCAAAAACCTTTGCTGGCCTTGCCTTAGGGAGTG
 TCCTTGAGGTACACTGTTCTGCAGCAGCTGCCTCAAGGACGCTCAAGACAGATCCAAGC
 AAAAGTTATTCAGTATTTTCTTCTAGTGGCTACGACTGGGACTGCAAAAACATAG
 ATTCATAAAGGGCTTTGTCTTGTCTTGGGTCTTTTTGTCTTTTATTTTAAATTGTGGGA
 AAATTTTTCAGTACTATCCCTGAGTTCATTAACCTACCATCACTAACATAATCATAAAGGG
 ATTTGGGGAGGTTGCTTAGTCTATCTTCTTGCCTTATGGCCACCTTGAACCTAAAATTC
 CCAGATTCCCTCTAACCAATGAATCCCGTTTCTGAGATTGACTTAAGCAAAGACAGATTA
 GTACTTCTAAAAATTTCCCTTTTACTAGTTTTCTATTTCTACCCAGTAGGGATTTTTG
 TCTATTGTAAGAATTATACATTCATGACCCCAAAGAATCACACCAAGACTTTAGGGCCC
 CTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGAC
 TCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAG
 TCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACA
 TTTTATCTGTAGGGGAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTG
 TCTCTACCTCTGTCTTGTCTTGTCTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTG
 TCCCTGAGACTCCTCTGCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCCTGGCCAG
 TCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAGCCCCTCTC
 CCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGAT
 AGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCAT
 GTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAA
 ATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGAAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAG
 CATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAC
 TTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCC
 ATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
 CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
 TGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC
 CGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
 CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGG
 TGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
 GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTA
 TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACA
 TCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGAC
 GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
 CCCCACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCA
 CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

10

20

30

40

1kb.BTKp.GFP (配列番号27)

GCATTTCCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
 CAAACTGTAGTCTGTTAGCTCACCCTAGAAGAAGGAAATTCTAGAGTCAAGAGAAGTTA
 AGTTTTAGACAAGCTGGAAGTTGGAATATACTGGAGTTTAAAGATCATTGACTCAATGAA
 AAAAAAAAAAGATTTGTCTGCAGTAAAACCAGAGTTTTTAAAAATGATTAGAAATGGACC
 AGAAAAGAGATAAGGATAATGAGAAAGGGGGCTCTTAAACTATTTGGAAGTGAAT
 GGGACAATGTTTCTGGAAACTATTTTGGCAGTATGTATCAAAATGCAAAATGCACATAC

50

TTTTTTGACTCTGGAAATGATGCTTGTATAGAGATCCTAATAACATGGGAAAATAATTA
GGAATAATGTTAAATAAGAACATTAGATCTTTTTTTGGAAAAAGGTACCTTGAACGGAT
GGATGGATGGATAGATACATACATACATGCATACATACATACATAGATGTTACGAAAAA
TAGGTAATTAACCTGAATGTGCAATATGATCTCAAATATTATAAGAAACACACACAGAA
AAAAATGGAAGGAATATGCCGATATATTAATGCCTCTGGATGAGTTTATGAATGATTTT
TTCTTTTTTATATCCCTGTACTTGACATATTTTCTACAATAAGCATGTTTTATTTTACTA
TATTTTGTTTTATTTTGGAGATGGGGGTCTCCCTATGTTTCTCAGGCTGACCTTGAACCTC
TGGGCTCAAGCAATCCTCCAATATCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGTGCACCC
CACTGCACCCAGCTGCGTGTGTTATTTTGGATATCGATGGAAAAAATAAATAAAATGTTT
AAGCCAAGGAAAACAAAACTAGGTTGAAAAAGAAGGCCAAAAGGGCACACAAGTCCA
GAGTGAAAGACAGACACCCAGCAGTCACCCTCAGAGCAGAGGGAGAATATTGAAAGTA
TTACCACTGATCTGATCTGGCACTGACTATAAACTTGCAGATTGGCTCTCTGGCTCTCC
TTCCATCATCAGTTGGCCAGAAGGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATA
CCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATC
CCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACA
AGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAATGCTTTCTTA
GAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCCTTTGGG
GTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAG
GAGACTCGAAAAACGCTCTTCCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAG
CATCTCTCCTCTTTCCCTGTAAGCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAG
GTATGTTGTCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCC
CCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTC
AAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGG
AATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTG
GTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGTGAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTC
AGACTGTCCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAG
GGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAA
CGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA
CCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACC
ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGG
ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC
CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCT
GGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCA
TCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTA
CCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCC
TGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
CONTIG.BTKp.GFP (配列番号28)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
CCTCAAAAAGAATACATAGCAGCACCAATTCTATCATAGTGTGTCTTGTCTATGATAAC
TGCATTGAGAAAGATGCTCTGCTTGTGAGTGAGCATTTCACTTCTTCTGTTTCTGAC
TATCTGTCTAATAGTGGTTCATGTGGGTTGAAAAGATAGAAAAGGGGAGTAGTATTAGGA
AGTTCAGTATGAGGAAGACTTATTAGACTTATGCATAAACCTAAATTCTGTTGTAATCT
GGAAGAGCTGAAGTGCCACATATGCATCTGTTTAGGAGAGCAAGAACTACAAATTTGGT
CTTCAGTTTGGCTTGTACATCCTGAGAACTCTGTAGGCCACATGTCGTGAATATAGC
AGCCTCTGCAACAGTGAAAGCCAGAAAAGGAAGTGGAAAGTCTCAGGGGAGGGGGCTTT
CTGTCATGGATTTATGAGCACAGCAAGACTAACAAAGCAAAAAGAAAAATGTAAAAGGAT
CTTGTTTCGTGTCCCTGACTATATCAAATTTACGAAACCTTTGAAAGAGGGGTATTTAG
ACACAGTTTTTACTACCAATGCCTTTCAACAAGATGACATTGTTTGGCTGCACTAGTGA

10

20

30

40

50

ACAATGCTGAACAGCAGATAATTTTAAATTAATTTATATTTGACTTCAGAATTTATTAT
 GTGATGTCTATAAACTCTGTGAGGGTTGGAACACATCTTATATATTTTCATGCATCTTC
 GTAACACCTAGCATGATGCCTTGTACATGGTTAAAAAATACTATTTGACTTGATGATA
 TTGCTTATTATATACCTTACCCTTTTTGAAGTAGGTTTGTAGTTCCAAATTTGATTTATT
 TTGGCTAATATTGGTGAGGGGAGGCCACTAGGTAGTGAGGTGGAGGTAATTAGCCATG
 AATTAATAATTTACTCCATATTATCCAAGTGAATAACCCATATGTAATAAATAAGACTT
 AATTTATATAGATTATCACTTCATTTCTTTCTTCTATACAAAGTCAGAATTTAATAATAAG
 AAAAAATACCCTTTGTTGGATAAAACAAAAATGTTATCTCCAGCAAGGGCAGACGGAGAC
 CTTATAAAATAAGTTTATGCATGAATTGAAGCACAAGTCAGGAGGACCTAAGAGTATGA
 AAAATTCTAAGAGCTTTTAAACGCTACATTCCTAGATATGAAGAGTTCAGGAATCCTTC
 AGATAGTTCACATAACCTGAACACCATTGCTGACTGAAGATTCTGCCATTGAGCTTAGT
 ATTCCATCATATGAATAAAAGATAAAATATTAGACTAAGAGTTTCCCAGTTCTATCACT
 ATCTCTCTAGTGCAATTTTGTAAATTTTAGGCACCTCCATTTCTCTATTTATTAAGAAAAG
 TCCCATTTTTTGCCTGAATACAAGGGTGGTGTGGCATTCAATGGTTATGCAATATTTA
 GAATCCTAAGTATAAAATACCTAGCTCCAAAAAATTAATAGATGATGTATGAGAGTGC
 TTGAAGTCAGAGTCAGAGAACCTGGTTTCAAGCCCTCTTTTACCATTTACAACTGGGT
 GATTTCTGGCAAGAAGGCCAACAAAGCTTCTTTGATGCTCAGTTTCTTCTTCTCAAAGGA
 GAATAATGGTAATTCATGCCACATCTACCTCTGGGGTTGTTGTAAGGATCAAATGAAGT
 AATAATACATGTAAAAGCACATGGAAAACCTGTAAATCACTGTATACGAAAGCACTGTAC
 ATCTCTTTGTTGTGGATAAATATTTCCCAAGGAAATATTTTCATATTCCTTGCTTTGTGAG
 GACCTAACTTGAACAGTTTCAGCATTTTCACATCAACCATAACAGTGTGTTTCAGATAAAC
 TTGACTGTAAATGCTTGCAGCACAGGATGCATGCACACATATTTGTGTGTATATATAGC
 CACATGTCAAGTGACTGAGAGATTAACCTGGTTGAGTTGACATCAGGAAAGGCTGCCTAG
 AGAAACAGGAAGGATGGCAGACTGATAATGGTATGGTTGGGTTATTGCATGACAGCCCT
 TTGTCTTAATAAACATTTAGATTCTGATACTCACTGGCTGGCTATACCAGCCTTGTACA
 CTCCCTTGAATGCAAGTTTGGTTGGTCAAATTAATATTAGCCAAGTCTTTCAACTGAA
 AGGGAACAGGAGGAACGAAGATGAAGGATCATCTATTCAATTATTGCTATGTGCCAGAT
 ATTGAGCTAAATACCTTTTATATATTATCTCATTTAATTTTCACAACAACCTTGGCCTAA
 AAACAACAACAATGATAACTAACACTTAATGAGCACTTACTATGTAGCAGGCTCTGTCC
 CAAGTGCTTCAAATGTATTACTTATTTGATCTTTGCAGTAGCCTTAAGAAGTATGTATT
 ATCCCTTATTTACAGATGAGGAACTGAAGCTCAAAGATGTTATCCTTATTTCTCTGG
 GGTAGGGTGGACTGGCCAGTTGCAAAAACCTTTGCTGGCCTTGCCTTAGGGAGTGT
 CTTGAGGTACACTGTTCTGCAGCAGCTGCCTCAAGGACGCTCAAGACAGATCCAAGCA
 AAAGTTATTCCTGATTTTCTTCTCTAGTGGCTACGACTGGGACTGCAAAAACATAGA
 TTCATAAAGGGCTTTGTCGTTGTCTTGGGTCTTTTTGTCTTTTATTTTAAATTGTGGGAA
 AATTTTCAGTACTATCCCTGAGTTCATTAACCTACCATCACTAACATAATCATAAAGGGA
 TTTGGGGAGGTTGCTTAGTCTATCTTCTTGCCTTATGGCCACCTTGAACCTAAAATTCCC
 AGATTCCTCTAACCAATGAATCCCGTTTCTGAGATTGACTTAAGCAAAGACAGATTAGT
 ACTTCTAAAAATTTCCCTTTTACTAGTTTTCTATTTCTACCCAGTAGGGATTTTTGTCT
 TATTGTAAGAATTATACATTCATGACCCCAAAGAATCACACCAAGACTTTAGGGCCCGT
 GAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTC
 AAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTC
 AACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATT
 TTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAAGTCTTGTCT
 TCTACCTCTGTCTTGTCTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTC
 CCTGAGACTCCTCTGCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTC
 TCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCTCTTTCCCTGTAAGCCCCTCTCCC
 TGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAG
 CTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGT
 TGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAAT

10

20

30

40

50

GAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGG AATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCA
 TGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGA
 GTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATT
 AGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCAT
 CCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
 AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
 CCCGTGCCCTGGCCACCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCG
 CTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG
 TCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGA
 GGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATA
 TCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATC
 GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCG
 CCCC GTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
 CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATCACT
 CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

10

3kb.BTKp.GFP (配列番号29)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
 CAAACTGTAGTCTGTTAGCTCACCCCTAGAAGAAGGAAATTCTAGAGTCAAGAGAAGTTA
 AGTTTTAGACAAGCTGGAAGTTGGAATATACTGGAGTTTAAGATCATTGACTCAATGAA
 AAAAAAAAAAGATTTGTCTGCAGTAAAACCAGAGTTTTAAAAATGATTAGAAATGGACC
 AGAAAAGAGATAAGGATAATGAGAAAGGGGGCTCTCTAAA ACTATTTGGAAGTGA AATT
 GGGACAATGTTTCTGGAAACTATTTTGGCAGTATGTATCAAAATGCAAAATGCACATAC
 TTTTTT GACTCTGGA AATGATGCTTGTATAGAGATCCTAATAACATGGGAAAATAATTA
 GGAATAATGTTAAATAAGAACATTAGATCTTTTTTTTGGAAAAAGGTACCTTGAACGGAT
 GGATGGATGGATAGATACATACATACATGCATACATACATACATAGATGTTACGAAAAA
 TAGGTAAATTA ACTGAATGTGCAATATGATCTCAAATATTATAAGAAACACACACAGAA
 AAAAATGGAAGGAATATGCCGATATATTAATGCCTCTGGATGAGTTTATGAATGATTTT
 TTCTTTTTTATATCCCTGTACTTGACATATTTTCTACAATAAGCATGTTTTATTTTACTA
 TATTTTGT TTTATTTTGGAGATGGGGGTCTCCCTATGTTTCTCAGGCTGACCTTGA ACTCT
 TGGGCTCAAGCAATCCTCCAATATCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGTGCACCC
 CACTGCACCCAGCTGCGTGTGTTATTTT GATATCGATGGAAAAATAAATAAAATGTTT
 AAGCCAAGGAAAACAAA ACTAGGTTGAAAAAGAAGGCCAAAAGGGCACACAAGTCCA
 GAGTGAAAGACAGACACCCAGCAGTCACCCTCAGAGCAGAGGGAGAATATTGAAAGTA
 TTACCACTGATCTGATCTGGCACTGACTATAAACTTGCAGATTGGCTCTCTGGCTCTCC
 TTCCATCATCAGTTGGCCAGAATATATTGTCGCTAATGCAAGACAAAAGAGATGATGA
 ATCACAGAGACCTAGAAGTTTCCAAAACCACAGAAGAAAAATGTAAATGCTAAAAACA
 TAAGGCCAGGCGCGGTGGCTCAAGCCTGTAATCCCAGCATTTTGGGAGGCCGAGGCAGG
 TGTCATGGTGTGCGGCTGTAGTCCAAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAAGAGAATTGCTT
 GAAACTGGGAGGTAGCGATTGCAGTGAGCCAAGATTGCGCTACTGTACCGAAGCCTGGA
 TGACAGAGCGAGACTCTGTCTCAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAACA
 TAACTGCTGTGGAAGAACCAGAGAGCCCTAAGGCCTCCTGTAAATGACTACAGCAGGAG
 AGTTTCCCTGGTCAGCATGCAGCTTTCGAAAATTGAGTTTGGCTTGATGCCTTCATCAC
 AAATTTGGTCCCTGTAGCCTT GACTATGAAGCTTATCATAAAATAATTGGGTTTCACT
 GGGGCCCGAACAAAAGCATCTTGGGAATTTAACAAGATTAAGGTTGCTTTGTTGCTGT
 GGGTATGATTTTTTTTTCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACGGAGTCTGACTCTGT
 CACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCTGGGT
 TCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAACTGGGATTACAGGTGCGCGCCACCA
 CGCCAGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGGTTTCTCCATGTTGGTCAAGGCTG
 GCTGCTCTCAAACTCCTGACCTTGCCATCCAGCCGCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGA

20

30

40

50

TTACAGGCATGAGCTACCCACACGTGGCCATATGTAAATTTTAAACATGTAAACCAATAC
TGTATATCTTTTATAGATATTTACATCTGTAATGATAATATGAAAACGTACCTAGGAAT
GATAAACACCAAATTC AAGATATTGGTAATCTCTAAGGAGGGAGAAGACTAAGATTTTG
GAGTACATAAAGGGGTCTTGATTATATAGATAGTATTTTCAGTTCTTAACACGTTCTCTT
CTGGTCCCAAGGCCAAGGAATTCTCAATTGAAATCTCAGTTAGAACGTGAAGGATGCTT
CTTGGGACTGGGAAGAGATTTTCCGTAGGCCAAATTTAACCTCCCCTAGAGATAGTTG
ATAATTCTACCACATTTTCATAGTGAAGCATCAGGAAGACAGGACTGAAAAGGCAAGAAG
GAATGATGCAAATTGCATAGTCCAAAAGATAAGCTGGACCTAGGTTTGCCAGTTTGTCT
AAGTAACTGAGAATTCATTCTGAGATCAAAAATCAAAAATAATGTTACAGCAGCATTG
TTTATCACTGAAAGCAAACAACCTAAATGTCCATCAACAGGAGAATGAATAAATATATT
GGAATGTATTCATCATATAGAATATTTTATGCATATAAAAATGAATTA AACATATGAA
GTAGA ACTAGCCAGATAAATAAATCCTAACATATTATATTGAGGGGAAAAAAGCAAGTT
GCTGGAGAATGTGTACCATATATATATATAAATTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
CGCGACCGAGTTTCACTCTTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCAAGATCTCGGCTCA
CTGCAACCTCTGCCTCCCGGTTCAAGGGATTCTCCCGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTG
GGAGAGTAGCGTTGGCCAGCTAGTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACAGGGTTTTCTCCAT
GTTGGTCAGGCTGGCTGCTCTCAAACCTCCTGACCTTGTTCATCCACCCGCCTCAGCCTCC
CAAAGTGCTGGGATTACAGGCCTGAGTTACCGCACGGGCCCCTGAGAAAACCTCCAGGC
TTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACA
TTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAAT
GGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAA
AAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGT
TTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGC
CCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAACGCTCTTCCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCT
GCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTC
ATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTG
CTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTTC
AAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGT
TGAGGGGGGTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAA
AAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGA ACTGAGTGGCTGTGAAAGGGT
GGGGTTTGCTCAGACTGTCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGGCCACCA
TGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGAC
GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTA
CGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCA
CCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
AAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT
CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACA
CCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG
GGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCA
GAAGAACGGCATCAAGGTGA ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGC
AGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCC
GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA
TCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC
TGTACAAGTAA

10

20

30

40

revCONTIG.BTKp.GFP (配列番号30)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
CTAAAGTCTTGGTGTGATTCTTTGGGGTCATGAATGTATAATTCTTACAATAGACAAAA
ATCCCTACTGGGGTAGAAATAGGAAA ACTAGTAAAAGGGAAATTTTTAGAAAGTACTAAT
CTGTCTTTGCTTAAGTCAATCTCAGAAACGGGATTCAATTGGTTAGAGGAATCTGGGAAT
TTTAGGTTCAAGGTGGCCATAAGGCAAGAAGATAGACTAAGCAACCTCCCCAAATCCCT

50

TTATGATTATGTTAGTGATGGTAGTTAATGAACTCAGGGATAGTACTGAAAATTTTCCC
 ACAATTA AAAAATAAAAGACAAAAGACCCAAGACAACGACAAAGCCCTTTATGAATCTA
 TGT TTTTGCAGTCCCAGTCGTAGCCACTAGAGGAAGAAAATCAGTGAATAACTTTTGCT
 TGGATCTGTCTTGAGCGTCCTTGAGGCAGCTGCTGCAGAACAGTGTACCTCAAGGACAC
 TCCCTAAGGCAAGGCCAGCAAAGGTAGTTTTTGCAACTGGCCAGTCCACCCTACCCCAG
 AGAAATAAGGATAACATCTTTGAGCTTCAGTTTCCTCATCTGTAAATAGGGGAATAATA
 CATACTTCTTAAGGCTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATTTGAAGCACTTGGGAC
 AGAGCCTGCTACATAGTAAGTGCTCATTAAAGTGTTAGTTATCATTGTTGTTGTTTTAG
 GCCAAGGTTGTTGTGAAAATTAATGAGATAATATATAAAAGGTATTTAGCTCAATATC
 TGGCACATAGCAATAATTGAATAGATGATCCTTCATCTTCGTTCCCTCCTGTTCCCTTTCA
 GTTTGAAAGACTTGGCTAATATAATTTTGACCAACCAAACCTTGCATTCAAGGGAGTGTA
 CAAGGCTGGTATAGCCAGCCAGTGAGTATCAGAATCTAAATGTTTATTAAGACAAAGGG
 CTGTCATGCAATAACCCAACCATACATTATCAGTCTGCCATCCTTCCTGTTTCTCTAGG
 CAGCCTTTCCTGATGTCAACTCAACCAGTTAATCTCTCAGTCACTTGACATGTGGCTAT
 ATATACACACAAATATGTGTGCATGCATCCTGTGCTGCAAGCATTACAGTCAAGTTTA
 TCTGAACACACTGTATGGTTGATGTGAAATGCTGAAACTGTTCAAGTTTAGGTCCTCAC
 AAAGCAAGGAATATGAAATATTTCCCTTGGGAAATATTTATCCACAACAAAGAGATGTAC
 AGTGCTTTTCGTATACAGTGATTTACAGTTTTCCATGTGCTTTTACATGTATTACTTCT
 ATTTGATCCTTACAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATGAATTACCATTATTCTCCTT
 TGAGAAGAAGAACTGAGCATCAAAGAAGCTTGTGGCCTTCTTGCCAGAAATCACCCA
 GTTTGTAATGGTAAAAGAGGGCTTGAACCAGGTTCTCTGACTCTGACTTCAAGCACT
 CTCATACATCATCTATTTAATTTTTTGGAGCTAGGTATTTTATACTTAGGATTCTAAATA
 TTGCATAACCATTTGAATGCCACACCACCCTTGATTTCAGTGCAAAAATGGGACTTTTC
 TTAATAAATAGAGAAATGGAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGCACTAGAGAGATAGTGA
 TAGAACTGGGAAACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTTATTCATATGATGGAATACTAA
 GCTCAATGGCAGAATCTTCAGTCAGCAATGGTGTTCAGGTTATGTGAACTATCTGAAGG
 ATTCCTGAACTCTTCATATCTAGGAATGTAGCGTTTAAAAGCTCTTAGAATTTTTCATA
 CTCTTAGGTCCTCCTGACTTGTGCTTCAATTCATGCATAAACTTATTTTATAAGGTCTCC
 GTCTGCCCTTGCTGGAGATAACATTTTTGTTTATCCAACAAAGGGTATTTTTATCTTATTA
 TTAATTCTGACTTTGTATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATCTATATAAATTAAGTCTT
 GATTAGTACATATGGGTTATTCAGTTGGATAATATGGAGTAAAATTTAATTCATGGCT
 AATTACCTCCACCTCCACTACCTAGTGGCCTCCCCTCACCAATATTAGCCAAAATAAAT
 CAAATTTGGAAC TACAAACCTACTTCAAAAAGGGTAAGGTATATAATAAGCAATATCAT
 CAAGTCAAATAGTATTTTTTTAACCATGTACAAGGCATCATGCTAGGTGTTACGAAGAT
 GCATGAAATATATAAGATGTGGTTCCAACCCTCACAGAGTTTATAGACATCACATAATA
 AATTCTGAAGTCAAATATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGTTGAGCATTGTTCACTA
 GTGCAGCCAAACAATGTCATCTTGTTGAAAGGCATTGGTAGTAAAACCTGTGTCTGAAA
 TACCCCTCTTTCAAAGGTTTCGTAAATTTGATATAGTCAGGGACACGAACAAGATCCTT
 TTACATTTTTCTTTTTGCTTGTAGTCTTGCTGTGCTCATAAATCCATGACAGAAAGCCC
 CCTCCCCTGAGACTTTCCACTTCCTTTTCTGGCTTTCAGTGTGAGAGGCTGCTATATT
 CACGACATGTGGCCTACAGAGTTCTCAGGATGTAAGCAAGCCAAACTGAAGACCAAATT
 TGTAGTTCTTGCTCTCCTAAACAGATGCATATGTGGCACTTCAGCTCTTCCAGATTACA
 ACAGAATTTAGGTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCTTCCCTCATACTGAACTTCTAATA
 CTACTCCCCTTTTCTATCTTTTCAACCCACATGACCCTATTAGACAGATAGTCAGAAC
 CAGAAGGAAGTGAATGCTCACTCAACAAGCAGAGCATCTTCTCAATGCAGTTATCAT
 AGACAAGACACACTATGATAGAATTGGTGCTGCTATGTATTCTTTTTGAGGGGCCCTG
 AGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCA
 AGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCA
 ACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTT
 TTATCTGTAGGGGAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCT

10

20

30

40

50

CTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCC
 CTGAGACTCCTCTGCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCT
 CTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCTCTCCCT
 GTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGC
 TTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTT
 GAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATG
 AAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCAT
 GCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGA
 GTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCTCTGGACTGTAAGAATT
 AGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCAT
 CCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
 AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
 CCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCG
 CTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG
 TCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGA
 GGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATA
 TCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATC
 GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCG
 CCCCCTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
 CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACT
 CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

10

20

IE.BTKp.GFP (配列番号31)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
 CACATCTTTGAGCTTCAGTTTCTCATCTGTAAATAGGGGAATAATACATACTTCTTAA
 GGCTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATTTGAAGCACTTGGGACAGAGCCTGCTAC
 ATAGTAAGTGCTCATTAAAGTGTAGTTATCATTGTTGTTGTTTTTAGGCCAAGGTTGTT
 GTGAAAATTAATGAGATAATATAAAAGGTATTTAGCTCAATATCTGGCACATAGCA
 ATAATTGAATAGATGATCCTTCATCTTCGTTCCCTCCTGTTCCCTTTCAGTTTGAAAGACT
 TGGCTAATATAATTTTGACCAACCAACTTGCATTCAAGGGAGTGTACAAGGCTGGTAT
 AGCCAGCCAGTGAGTATCAGAATCTAAATGTTTATTAAGACAAAGGGCTGTCATGCAAT
 AACCCAACCATAACCATTCAGTCTGCCATCCTTCTGTTTCTCTAGGCAGCCTTTCCTG
 ATGTCAACTCAACCAGTTAATCTCTCAGTCACTTGACATGTGGCTATATATACACACAA
 ATATGTGTGCATGCATCCTGTGCTGCAAGCATTACAGTCAAGTTTATCTGAACACACT
 GTATGGTTGATGTGAAATGCTGAAACTGTTCAAGTTTAGGTCCTCACAAAGCAAGGAAT
 ATGAAATATTTCTTGGGAAATATTTATCCACAACAAAGAGATGTACAGTGCTTTGTA
 TACAGTGATTTACAGTTTTCCATGTGCTTTTACATGTATTATTACTTCAATTTGATCCTTA
 CAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATGAATTACCATTATTCTCCTTTGAGAAGAAGAA
 ACTGAGCATCAAAGAAGCTTGTGGCCTTCTTGCCAGAAATCACCCAGTTTGTAATGG
 TAAAAGAGGGCTTGAAACCAGGTTCTCTGACTCTGACTTCAAGCACTCTCATACATCAT
 CTATTTAATTTTTTGGAGCTAGGTATTTTATACTTAGGATTCTAAATATTGCATAACCAT
 TGAATGCCACACCACCCTTGTATTCAGTGCAAAAAATGGGACTTTTCTTAATAAATAGA
 GAAATGGAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGCACTAGAGAGATAGTGATAGAAGTGGGAA
 ACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTTATTCATATGATGGAATACTAAGCTCAATGGCAG
 AATCTTCAGTCAGCAATGGTGTTTCAAGTTATGTGAACTATCTGAAGGATTCCTGAACCT
 TTCATATCTAGGAATGTAGCGTTTAAAAGCTCTTAGAATTTTTTACTACTCTTAGGTCT
 CCTGACTTGTGCTTCAATTCATGCATAAACTTATTTTATAAGGTCTCCGTCTGCCCTTGC
 TGGAGATAACATTTTTGTTTATCCAACAAAGGGTATTTTATCTTATTATTAATTTCTGA
 CTTTGTATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATCTATATAAATTAAGTCTTGATTAGTACAT
 ATGGGTTATTCACCTGGATAATATGGAGTAAAATTTTAAATTCATGGCTAATTACCTCCA

30

40

50

CCTCCACTACCTAGTGGCCTCCCTCACCAATATTAGCCAAAATAAATCAAATTTGGAA
 CTACAAACCTACTTCAAAAAGGGTAAGGTATATAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATA
 GTATTTTTTTAACCATGTACAAGGCATCATGCTAGGTGTTACGAAGATGCATGAAATAT
 ATAAGATGTGGTTCCAACCTCACAGAGTTTATAGACATCACATAATAAATTCTGAAGT
 CAAATATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGTTGAGCATTGTTCACTAGTGCAGCCAAA
 CAATGTCATCTTGTGAAAGGCATTGGTAGTAAAACTGTGTCTGAAATACCCCTCTTT
 CAAAGGTTTCGTAAATTTGATATAGTCAGGGACACGAACAAGATCCTTTTACATTTTTC
 TTTTTGCTTGTAGTCTTGCTGTGCTCATAAATCCATGACAGAAAGCCCCCTCCCTGA
 GACTTCCACTTCTTTTCTGGCTTTCAGTGTGACAGAGGCTGCTATATTCACGACATGT
 GGCCTACAGAGTTCTCAGGATGTAAGCAAGCCAAACTGAAGACCAAATTTGTAGTTCTT
 GCTCTCCTAAACAGATGCATATGTGGCACTTCAGCTCTTCCAGATTACAACAGAATTTA
 GTTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCTTCTCATACTGAACTTCTAATACTACTCCCCTT
 TTCTATCTTTTCAACCCACATGACCACTATTAGACAGATAGTCAGAACCAGAAGGAAGT
 GAAATGCTCACTCAACAAGCAGAGCATCTTTCTCAATGCAGTTATCATAGACAAGACAC
 ACTATGATAGAATTGGTGTGCTATGTATTCTTTTTGAGGCCCTGAGAAAACCTCCAG
 GCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGA
 CATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAA
 ATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGG
 AAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTT
 GTTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCT
 GCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGT
 CTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCT
 TCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTC
 TGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTT
 TCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCTCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACA
 GTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGA
 AAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAG
 GGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGGCCA
 CCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTG
 GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCAC
 CTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGC
 CCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTACAGCCGCTACCCCGACCAC
 ATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCAC
 CATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG
 ACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC
 CTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
 GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
 TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGGTGCTGCTG
 CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCG
 CGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACG
 AGCTGTACAAGTAA

10

20

30

40

0.7UCOE.IE.BTKp.GFP (配列番号32)

GCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
 GCGTGTGGCATCTGAAGCACCACCAGCGAGCGAGAGCTAGAGAGAAGGAAAGCCACCGA
 CTTACCGCCTCCGAGCTGCTCCGGGTGCGGGTCTGCAGCGTCTCCGGCCCTCCGCGC
 CTACAGCTCAAGCCACATCCGAAGGGGGAGGGAGCCGGGAGCTGCGCGCGGGGCGCCG
 GGGGGAGGGGTGGCACCGCCACGCCGGGCGGCCACGAAGGGCGGGGACGGGGCGCG
 CGCCCGGGCGGGGGAGGGGCGCGCGCCGCGCCCGCTGGGAATTGGGGCCCTAGGGGGG
 GGGCGGAGGGCGCCGACCGCGGCACTTACCGTTCGCGGCGTGGCGCCCGGTGGTCCC
 CAAGGGGAGGGAAAGGGGGAGGGCGGGGCGAGGACAGTGACCGGAGTCTCCTCAGCGGTG

50

GCTTTTCTGCTTGGCAGCCTCAGCGGCTGGCGCCAAAACCGGACTCCGCCCACTTCCTC
GCCCTGCGGTGCGAGGGTGTGGAATCCTCCAGACGCTGGGGGAGGGGGAGTTGGGAGC
TAAAAACTAGTACCCCTTTGGGACCACTTTTACGACGCGAACTCTCCTGTACACCAGGG
GTCAGTTCCACAGACGCGGGCCAGGGGTGGGTCATTGCGGCGTGAACAATAATTTGACT
AGAAGTTGATTGGGGTGTGGCGGCCACATCTTTGAGCTTCAGTTTCCTCATCTGTAA
ATAGGGGAATAATACATACTTCTTAAGGCTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATTT
GAAGCACTTGGGACAGAGCCTGCTACATAGTAAGTGCTCATTAAAGTGTTAGTTATCATT
GTTGTTGTTTTTAGGCCAAGGTTGTTGTGAAAATTAATGAGATAATATATAAAAAGGTA
TTAGCTCAATATCTGGCACATAGCAATAATTGAATAGATGATCCTTCATCTTCGTTCC
TCCTGTTCCCTTTAGTTTGAAGACTTGGCTAATATAATTTTGACCAACCAAACCTTGC
ATTCAAGGGAGTGTAACAAGGCTGGTATAGCCAGCCAGTGAGTATCAGAATCTAAATGTT
TATTAAGACAAAGGGCTGTCATGCAATAACCCAACCATAACCATTATCAGTCTGCCATCC
TTCCTGTTTCTCTAGGCAGCCTTTCCTGATGTCAACTCAACCAGTTAATCTCTCAGTCAC
TTGACATGTGGCTATATATACACACAAATATGTGTGCATGCATCCTGTGCTGCAAGCAT
TTACAGTCAAGTTTATCTGAACACACTGTATGGTTGATGTGAAATGCTGAAACTGTTCA
AGTTTAGGTCCTCACAAAGCAAGGAATATGAAATATTTCTTGGGAAATATTTATCCAC
AACAAAGAGATGTACAGTGCTTTCGTATACAGTGATTTACAGTTTTCCATGTGCTTTTA
CATGTATTACTTTCATTTGATCCTTACAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATGAAT
TACCATTATTCTCCTTTGAGAAGAAGAACTGAGCATCAAAGAAGCTTGTTGGCCTTCT
TGCCAGAAATCACCCAGTTTGTAAATGGTAAAAGAGGGCTTGAACCAGGTTCTCTGAC
TCTGACTTCAAGCACTCTCATACATCTATTTAATTTTTTGGAGCTAGGTATTTTATA
CTTAGGATTCTAAATATTGCATAACCATTGAATGCCACACCACCCTTGTATTCAGTGCA
AAAAATGGGACTTTTCTTAATAAATAGAGAAATGGAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGC
ACTAGAGAGATAGTGATAGAAGTGGGAACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTTATTCA
TATGATGGAATACTAAGCTCAATGGCAGAATCTTCAGTCAGCAATGGTGTTTCAGGTTAT
GTGAACTATCTGAAGGATTCCTGAACTCTTCATATCTAGGAATGTAGCGTTTAAAAGCT
CTTAGAATTTTTCATACTCTTAGGTCCTCCTGACTTGTGCTTCAATTCATGCATAAACTT
ATTTTATAAGGTCTCCGTCTGCCCTTGCTGGAGATAACATTTTTGTTTATCCAACAAAG
GGTATTTTATCTTATTATTAAATTCTGACTTTGTATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATC
TATATAAATTAAGTCTTGATTAGTACATATGGGTTATTCAGTTGGATAATATGGAGTAA
AATTTTAATTCATGGCTAATTACCTCCACCTCCACTACCTAGTGGCCTCCCCTCACCAAT
ATTAGCCAAAATAAATCAAATTTGGAACCTACAAACCTACTTCAAAAAGGGTAAGGTATA
TAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATAGTATTTTTTAAACCATGTACAAGGCATCATGC
TAGGTGTTACGAAGATGCATGAAATATATAAGATGTGGTTCCAACCCTCACAGAGTTTA
TAGACATCACATAATAAATTCTGAAGTCAAATATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGT
TCAGCATTGTTCACTAGTGCAGCCAAACAATGTCATCTTGTTGAAAGGCATTGGTAGTA
AAAACCTGTGTCTGAAATACCCCTCTTTCAAAGGTTTCGTAATTTGATATAGTCAGGGA
CACGAACAAGATCCTTTTACATTTTTCTTTTTGCTTGTTAGTCTTGCTGTGCTCATAAAT
CCATGACAGAAAGCCCCCTCCCCTGAGACTTTCCACTTCCTTTTCTGGCTTTCACTGTTG
CAGAGGCTGCTATATTCACGACATGTGGCCTACAGAGTTCTCAGGATGTAAGCAAGCCA
AACTGAAGACCAAATTTGTAGTTCTTGCTCTCCTAACAGATGCATATGTGGCACTTCA
GCTCTTCCAGATTACAACAGAATTTAGGTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCTTCCCTCAT
ACTGAACTTCTAATACTACTCCCCTTTTCTATCTTTTCAACCCACATGACCACTATTAG
ACAGATAGTCAGAACCAGAAGGAAGTGAAATGCTCACTCAACAAGCAGAGCATCTTTCT
CAATGCAGTTATCATAGACAAGACACACTATGATAGAATTGGTGCTGCTATGTATTCTT
TTTGAGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGG
TTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAA
ATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTA
TATTCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGG
GGAAGTCTTGCTCTACCTCTGTCTTGTTTTGCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTT

10

20

30

40

50

CAACTGTGTGTCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCT
 TCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTGA
 AGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTC
 TGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGC
 CCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGTCAGAGGT
 CCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGA
 ACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTGAGGAAGCAAAAA
 AAGGGAAGTGTGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGA
 CTGTAAGAATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGG
 GTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTG
 CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA
 CCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAG
 TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
 CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
 GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC
 GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCA
 CAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCC
 GCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC
 ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCT
 GAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCG
 CCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

10

20

0.7UCOE.BTKp.coBTK (配列番号33)

CCGCGTGTGGCATCTGAAGCACCACCAGCGAGCGAGAGCTAGAGAGAAGGAAAGCCACC
 GACTTCACCGCCTCCGAGCTGCTCCGGGTGCGGGTCTGCAGCGTCTCCGGCCCTCCGC
 GCCTACAGCTCAAGCCACATCCGAAGGGGGAGGGAGCCGGGAGCTGCGCGCGGGGCCG
 TGGGGGGAGGGTGGCACCGCCACGCCGGGCGGCCACGAAGGGCGGGGCAGCGGGCG
 CGCGCCCGGCGGGGGGAGGGGCCGCGCGCCGCGCCCGCTGGGAATTGGGGCCCTAGGGG
 GAGGGCGGAGGGCGCCGACGACCGCGGCACTTACCGTTCGCGGCGTGGCGCCCGGTGGTC
 CCCAAGGGGAGGGAAGGGGGAGGGCGGGGCGAGGACAGTGACCGGAGTCTCCTCAGCGG
 TGGCTTTTCTGCTTGGCAGCCTCAGCGGCTGGCGCCAAAACCGGACTCCGCCCACTTCC
 TCGCCCTGCGGTGCGAGGGTGTGGAATCCTCCAGACGCTGGGGGAGGGGGAGTTGGGA
 GCTTAAAAACTAGTACCCCTTTGGGACCACTTTAGCAGCGAACTCTCCTGTACACCAG
 GGGTCAGTTCACAGACGCGGGCCAGGGGTGGGTCAATTGCGGCGTGAACAATAATTTGA
 CTAGAAGTTGATTCCGGGTGTTTTCGGCCGGGGCTAGCTACGACGCGTTCGGGAATTCGC
 CCTTGCATTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGG
 GGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTAC
 AGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGA
 GAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTC
 CGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAAG
 TCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACT
 GTGTGTCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTG
 GCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAGCCC
 CTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGA
 GGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAG
 TCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGTCAGAGGTCCCAA
 GCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAAACCAG
 ATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTGAGGAAGCAAAAAAAGGG
 AACTGAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTA
 AGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTCCT
 GAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCC

30

40

50

TGCTGACAGTGCACAAGCTGTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCGCCGAGGA
TCAAAAAAGGGGAGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGA
AAAGAATCCACCCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCCTCTGAGATGG
AGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGA
CCTGTATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACACCAGCTGAA
GAACGTGATTAGATAACAATAGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCCCTTGTTTTTGGATCG
ACGGGCAGTACCTGTGCTGTTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTG
GAAAATCGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCCCT
GCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTG
CAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAACTGAAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCC
ATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGAGTATTTTATTCTGGAAGAGTC
TAATCTGCCTTGTTGGAGGGCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTA
ATTATGTGACCGAGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATG
ACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTATCGT
GCGGATTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTGTCAGTGTTCGCTAAGAGCACCGGAG
ACCCCAGGGCGTGATCAGACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTAT
CTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAGTACAATCCCAGAGCTGATTAACTACCACCAGCACAA
TTCTGCCGGCCTGATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCAGCAGAACAAAATGCTC
CTTCTACCGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTC
CTGAAGGAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGCA
GTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCG
AGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTGTCCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTG
TGCACCAAGCAGCGGCCCATTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCT
GAACTATCTGCGCGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCA
AGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTG
GCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGACT
GTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCCTGTGA
GATGGTCTCCACCCGAGGTGCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGG
GCCTTTGGCGTGCTGATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTT
CACAAATTCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATC
TGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACGAG
AGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA
IE.BTKp.coBTK (配列番号34)

10

20

30

GCATTTCCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCC
CACATCTTTGAGCTTCAGTTTCCCTCATCTGTAAATAGGGGAATAATACATACTTCTTAA
GGCTACTGCAAAGATCAAATAAGTAATACATTTGAAGCACTTGGGACAGAGCCTGCTAC
ATAGTAAGTGCTCATTAAAGTGTTAGTTATCATTGTTGTTGTTTTTAGGCCAAGGTTGTT
GTGAAAATTAATGAGATAATATATAAAAGGTATTTAGCTCAATATCTGGCACATAGCA
ATAATTGAATAGATGATCCTTCATCTTCGTTCCCTCCTGTTCCCTTTAGTTTGAAGACT
TGGCTAATATAATTTTGACCAACCAAACTTGCATTCAAGGGAGTGTACAAGGCTGGTAT
AGCCAGCCAGTGAGTATCAGAATCTAAATGTTTATTAAGACAAAGGGCTGTCATGCAAT
AACCCAACCATAACCATTATCAGTCTGCCATCCTTCCCTGTTTCTCTAGGCAGCCTTTCCCTG
ATGTCAACTCAACCAGTTAATCTCTCAGTCACTTGACATGTGGCTATATATACACACAA
ATATGTGTGCATGCATCCTGTGCTGCAAGCATTTACAGTCAAGTTTATCTGAACACACT
GTATGGTTGATGTGAAATGCTGAAACTGTTCAAGTTTAGGTCCTCACAAAGCAAGGAAT
ATGAAATATTTCCCTTGGGAAATATTTATCCACAACAAAGAGATGTACAGTGCTTTTCGTA
TACAGTGATTTACAGTTTTCCATGTGCTTTTACATGTATTATTACTTTCATTTGATCCTTA
CAACAACCCAGAGGTAGATGTGGCATGAATTACCATTATTCTCCTTTGAGAAGAAGAA
ACTGAGCATCAAAGAAGCTTGTTGGCCTTCTTGCCAGAAATCACCCAGTTTGTAATGG
TAAAAGAGGGCTTGAAACCAGGTTCTCTGACTCTGACTTCAAGCACTCTCATACATCAT

40

50

CTATTTAATTTTTGGAGCTAGGTATTTTATACTTAGGATTCTAAATATTGCATAACCAT
TGAATGCCACACCACCCTTGTATTTCAGTGCAAAAAATGGGACTTTTCTTAATAAATAGA
GAAATGGAGGTGCCTAAAATTACAAAATTGCACTAGAGAGATAGTGATAGAACTGGGAA
ACTCTTAGTCTAATATTTTATCTTTTATTCATATGATGGAATACTAAGCTCAATGGCAG
AATCTTCAGTCAGCAATGGTGTTCAGGTTATGTGAACTATCTGAAGGATTCTGAACTC
TTCATATCTAGGAATGTAGCGTTTAAAAGCTCTTAGAATTTTTTCATACTCTTAGGTCT
CCTGACTTGTGCTTCAATTCATGCATAAACTTATTTTATAAGGTCTCCGTCTGCCCTTG
TGGAGATAACATTTTTGTTTATCCAACAAAGGGTATTTTATCTTATTATTAATTCTGA
CTTTGTATAGAAGAGAAATGAAGTGATAATCTATATAAATTAAGTCTTGATTAGTACAT
ATGGGTTATTCACTTGGATAATATGGAGTAAAATTTAATTCATGGCTAATTACCTCCA
CCTCCACTACCTAGTGGCCTCCCTCACCAATATTAGCCAAAATAAATCAAATTTGGAA
CTACAAACCTACTTCAAAAAGGGTAAGGTATATAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATA
GTATTTTTTTAACCATGTACAAGGCATCATGCTAGGTGTTACGAAGATGCATGAAATAT
ATAAGATGTGGTCCAACCCTCACAGAGTTTATAGACATCATAATAAATTCTGAAGT
CAAATATAAATTAATTTAAAATTATCTGCTGTTGAGCATTGTTCACTAGTGCAGCCAAA
CAATGTCATCTTGTGAAAGGCATTGGTAGTAAAACTGTGTCTGAAATACCCCTCTTT
CAAAGGTTTCGTAAATTTGATATAGTCAGGGACACGAACAAGATCCTTTTACATTTTTTC
TTTTTGCTTGTAGTCTTGCTGTGCTCATAAATCCATGACAGAAAGCCCCCTCCCTGA
GACTTTCCACTTCTTTTCTGGCTTTCACTGTTGCAGAGGCTGCTATATTCACGACATGT
GGCCTACAGAGTTCTCAGGATGTAAGCAAGCCAAACTGAAGACCAAATTTGTAGTTCTT
GCTCTCCTAAACAGATGCATATGTGGCACTTCAGCTCTTCCAGATTACAACAGAATTTA
GGTTTATGCATAAGTCTAATAAGTCTTCCTCATACTGAACTTCCTAATACTACTCCCCTT
TTCTATCTTTTCAACCCACATGACCACTATTAGACAGATAGTCAGAACCAGAAGGAAGT
GAAATGCTCACTCAACAAGCAGAGCATCTTTCTCAATGCAGTTATCATAGACAAGACAC
ACTATGATAGAATTGGTGTGCTATGTATTCTTTTTGAGGCCCTGAGAAAACCTCCAG
GCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGA
CATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAA
ATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGG
AAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTT
GTTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCT
GCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGT
CTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAAGCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCT
TCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTC
TGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTT
TCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCTCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACA
GTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGA
AAAAAAGACATTGGTTTAGGTGAGGAAGCAAAAAAGGGAAGTCTGAGTGGCTGTGAAAG
GGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGAAAG
AAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTCCTGAAGAGGTCCCAGCAGAAA
AAGAAAACCTCTCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCTGCTGACAGTGCACAAGCT
GTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCCGCGAGGATCAAAAAGGGGAGCATCG
ATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATCCACCCCTGAG
AGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCTCTGAGATGGAGCAGATTAGTATCATTGA
GCGCTTCCCCTATCCTTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCAC
CCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACCAGCTGAAGAACGTGATTAGATACAAT
AGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCTTGTTTTTGGATCGACGGGCAGTACCTGTGCTG
TTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATCGGAACGGATCTC
TGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCCCTGCCTCCAACACCCGAGGAG
GATCAGATCCTGAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTC
CGAACTGAAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGC

10

20

30

40

50

AGCTGAGAAAGGGCGACGAGTATTTTCATTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGG
GCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGACCGAGGCTGA
GACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGGTCCCAGGCTGAGC
AGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGGAGGGTTTATCGTGCGCGATTCTAGTAAGGCC
GGCAAATACACTGTGTCAAGTGTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGATCAG
ACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAGCACCTGT
TTAGTACAATCCCAGAGCTGATTAACTACCACCAGCACAAATTCTGCCGGCCTGATCAGC
AGGCTGAAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAACAAAAATGCTCCTTCTACCGCTGGACTGGG
GTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTCTGAAGGAGCTGGGAACTG
GGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAG
ATGATCAAGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGAT
GAACCTGTCCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCCCA
TTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTGCGCGAGATG
AGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAATGTGCAAGGATGTGTGTGAGGCTAT
GGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGG
TGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTGGAT
GACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGT
GCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTGTGATGT
GGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGTTTCAAAATTCGAGACAGCT
GAGCACATCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATCTGGCCTCTGAGAAGGTGTA
CACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACGAGAGACCCACATTCAAGATCC
TGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

10

20

0.7UCOE.IE.BTKp.coBTK (配列番号35)

CCGCGTGTGGCATCTGAAGCACCACCAGCGAGCGAGAGCTAGAGAGAAGGAAAGCCACC
GACTTCACCGCCTCCGAGCTGCTCCGGGTGCGGGTCTGCAGCGTCTCCGGCCCTCCGC
GCCTACAGCTCAAGCCACATCCGAAGGGGGAGGGAGCCGGGAGCTGCGCGCGGGGCCG
TGGGGGAGGGGTGGCACCGCCACGCCGGCGGCCACGAAGGGCGGGGCAGCGGGCG
CGCGCCCGGCGGGGGGAGGGGGCCGCGCGCCGCGCCCGCTGGGAATTGGGGCCCTAGGG
GAGGGCGGAGGGCGCGGACGACCGCGGCACTTACCGTTTCGCGGCGTGGCGCCCGGTGGTC
CCCAAGGGGAGGGAAGGGGGAGGGCGGGGCGAGGACAGTGACCGGAGTCTCCTCAGCGG
TGGCTTTTCTGCTTGGCAGCCTCAGCGGCTGGCGCCAAAACCGGACTCCGCCCACTTCC
TCGCCCTGCGGTGCGAGGGTGTGGAATCCTCCAGACGCTGGGGGAGGGGGAGTTGGGA
GCTTAAAACTAGTACCCCTTTGGGACCACTTTCAGCAGCGAACTCTCCTGTACACCAG
GGGTCAGTTCACAGACGCGGGCCAGGGGTGGGTCATTGCGGCGTGAACAATAATTTGA
CTAGAAGTTGATTGCGGTGTTTGGCGCCGGGGCTAGCACATCTTTGAGCTTCAGTTTCC
TCATCTGTAAATAGGGGAATAATACATACTTCTTAAGGCTACTGCAAAGATCAAATAAG
TAATACATTTGAAGCACTTGGGACAGAGCCTGCTACATAGTAAGTGCTCATTAAAGTGT
AGTTATCATTGTTGTTGTTTTAGGCCAAGGTTGTTGTGAAAATTAATGAGATAATAT
ATAAAAGGTATTTAGCTCAATATCTGGCACATAGCAATAATTGAATAGATGATCCTTCA
TCTTCGTTCTCCTGTTCCCTTTAGTTTGAAGACTTGGCTAATAATTTTGACCAAC
CAAATTGCATTCAAGGGAGTGTACAAGGCTGGTATAGCCAGCCAGTGAGTATCAGAAT
CTAAATGTTTATTAAGACAAAGGGCTGTCATGCAATAACCCAACCATAACCATTATCAGT
CTGCCATCCTTCTGTTTCTTAGGCAGCCTTTCTGATGTCAACTCAACCAGTTAATCT
CTCAGTCACTTGACATGTGGCTATATATACACACAAATATGTGTGCATGCATCCTGTGC
TGCAAGCATTACAGTCAAGTTTATCTGAACACACTGTATGGTTGATGTGAAATGCTGA
AACTGTTCAAGTTTAGGTCCTCACAAAGCAAGGAATATGAAATATTTCTTGGGAAATA
TTTATCCACAACAAAGAGATGTACAGTGCTTTTCGTATACAGTGATTTACAGTTTTCCAT
GTGCTTTTACATGTATTACTTTCATTTGATCCTTACAACAACCCAGAGGTAGATGT
GGCATGAATTACCATTATTCTCCTTTGAGAAGAAGAACTGAGCATCAAAGAAGCTTGT
TGGCCTTCTTGCCAGAAATCACCCAGTTTGTAAATGGTAAAAGAGGGCTTGAACCAGG

30

40

50

TTCTCTGACTCTGACTTCAAGCACTCTCATACATCATCTATTTAATTTTTTTGGAGCTAGG
 TATTTTATACTTAGGATTCTAAATATTGCATAACCATTGAATGCCACACCACCTTGTA
 TTCAGTGCAAAAAATGGGACTTTTTCTTAATAAATAGAGAAATGGAGGTGCCTAAAATTA
 CAAAATTGCACTAGAGAGATAGTGATAGAAGCTGGGAAACTCTTAGTCTAATATTTTATC
 TTTTATTCATATGATGGAATACTAAGCTCAATGGCAGAATCTTCAGTCAGCAATGGTGT
 TCAGGTTATGTGAAGTATCTGAAGGATTCCTGAAGTCTTCATATCTAGGAATGTAGCGT
 TAAAAGCTCTTAGAATTTTTTCACTACTCTTAGGTCTCCTGACTTGTGCTTCAATTCATG
 CATAAACTTATTTTATAAGGTCTCCGTCTGCCCTTGCTGGAGATAACATTTTTGTTTATC
 CAACAAAGGGTATTTTATCTTATTATTAATTCTGACTTTGTATAGAAGAGAAATGAAG
 TGATAATCTATATAAATTAAGTCTTGATTAGTACATATGGGTTATTTCACTTGGATAATA
 TGGAGTAAAATTTTAATTCATGGCTAATTACCTCCACCTCCACTACCTAGTGGCCTCCC
 CTCACCAATATTAGCCAAAATAAATCAAATTTGGAAGTACAAACCTACTTCAAAAAGGG
 TAAGGTATATAATAAGCAATATCATCAAGTCAAATAGTATTTTTTTAACCATGTACAAG
 GCATCATGCTAGGTGTTACGAAGATGCATGAAATATATAAGATGTGGTTCCAACCTCA
 CAGAGTTTATAGACATCACATAATAAATTCTGAAGTCAAATATAAATTAATTTAAAATT
 ATCTGCTGTTGAGCATTGTTCACTAGTGCAGCCAAACAATGTCATCTTGTTGAAAGGCA
 TTGGTAGTAAAACTGTGTCTGAAATACCCCTCTTTCAAAGGTTTCGTAAATTTGATAT
 AGTCAGGGACACGAACAAGATCCTTTTACATTTTTCTTTTTGCTTGTTAGTCTTGCTGTG
 CTCATAAATCCATGACAGAAAGCCCCCTCCCTGAGACTTTCCACTTCTTTTTCTGGCTT
 TCACTGTTGCAGAGGCTGCTATATTCACGACATGTGGCCTACAGAGTTCTCAGGATGTA
 AGCAAGCCAACTGAAGACCAAATTTGTAGTTCTTGCTCTCCTAACAGATGCATATGT
 GGCACCTCAGCTCTTCCAGATTACAACAGAATTTAGGTTTATGCATAAGTCTAATAAGT
 CTTCTCATACTGAACTTCCCTAATACTACTCCCTTTTCTATCTTTTTCAACCCACATGAC
 CACTATTAGACAGATAGTCAGAACCAGAAGGAAGTGAATGCTCACTCAACAAGCAGAG
 CATCTTTCTCAATGCAGTTATCATAGACAAGACACACTATGATAGAATTGGTGCTGCTA
 TGTATTCTTTTTGAACGCGTTCCGGAATTCGCCCTTGCAATTTCTAGGAGAATCCCTGG
 GGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCA
 AGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGA
 GAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGG
 AAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCGGACATTTTTTATCTGTAGGGGAAAAAT
 GCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTTTTG
 TCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCG
 GAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTGTCTGTGTCTGCCA
 GCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAG
 TACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCA
 GGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAG
 ATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAG
 GGGGTGGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAA
 GACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGG
 TTTGCTCAGACTGTCTTCCCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCAC
 CATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTCCTGAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAA
 CCTCTCCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCCCTGCTGACAGTGCACAAGCTGTCTTAC
 TATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCCCGAGGATCAAAAAAGGGGAGCATCGATGTGGA
 GAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATCCACCCCTGAGAGGCAGA
 TCCAAGACGGGGCGAGGAGTCTCTGAGATGGAGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTC
 CCCTATCCTTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCACCCACAGA
 GGAGCTGAGAAAAGAGGTGGATTCACCAGCTGAAGAACGTGATTAGATACAATAGCGATC
 TGGTGCAGAAGTATCACCTTGTTTTTGGATCGACGGGCAGTACCTGTGCTGTTCCCAG
 ACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATCGGAACGGATCTCTGAAACC
 AGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAGCCCTGCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGA

10

20

30

40

50

TCCTGAAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAACTG
 AAAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAG
 AAAGGGCGACGAGTATTTTATTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGGGCCAGAG
 ATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGACCGAGGCTGAGGACTCT
 ATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTGCT
 GAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTATCGTGCGGATTCTAGTAAGGCCGGCAAAT
 ACACTGTGTCAGTGTTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGATCAGACACTAT
 GTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAGTAC
 AATCCCAGAGCTGATTAACACCACCAGCACAAATTCTGCCGGCCTGATCAGCAGGCTGA
 AGTATCCCGTCTCCAGCAGAACAATAATGCTCCTTCTACCGCTGGACTGGGGTACGGC
 AGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTCTGAAGGAGCTGGGAAGTGGGCAGTT
 TGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCA
 AGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTG
 TCCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCCCATTTTTAT
 CATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTGCGCGAGATGAGACACA
 GATTCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTAC
 CTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGA
 TCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGT
 ACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGTGCTGATG
 TATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTGTGATGTGGGAAAT
 CTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTACAAAATTCCGAGACAGCTGAGCACA
 TCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATCTGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATC
 ATGTACAGCTGTTGGCAGGAGAAGGCCGACGAGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTC
 CAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

10

20

ABCD.BTKp.GFP (配列番号36)

TTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCGG
 ATCCCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCT
 AAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGGCATTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGACGG
 AGGGTGGGAGTGTTCATCAGCACAAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTGAATTAGAGAGGCC
 GAAAGGGTCTTTCCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGAC
 ATGAGGTGACCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGCAAACCTTA
 GTGGAAAAGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAACAAGCCCTTCTGTCAAATAGT
 GCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAATGAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAA
 GAGGCAGATTCTCTGAGAACATGGTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTT
 TGTGAGCTAGGGAAAGGCCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTAC
 CAGGCCAAATGTCGCCAGGGTTCAGAGCTGGCTTATTAAAGGACTGTGTGGAAGCTGTGC
 CAACCTCGTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGCAGCCTCTGCCTCAG
 CCCAGACAGTGCGGCCAACCCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTTCTCCTCTTACCATTGCC
 CTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTGTCTTCATTATTTCTCCTTTCTTTCTCGGA
 TCCACGCGTGAATTCTTTGTAACCTCCTTATGGTGCGAACATAATGTAACCTTCCATCCA
 GTTATGGGGGATTGGTGCATTTTAAATTATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGC
 AAATTTCTATAGAGTTTCTTTTCTTTCAGTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTAGGT
 ATAAAGGGAAGATACAGCTTTTCAAACCAAGTTTGGGCGTTCTCAAAGAGTTATCA
 GATACCCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGATTGCTAACTACTGA
 AAATAAGGAAGAACTAGAATTTTCAAGTACACAGTGTCTCAGCAAGAAGCTAGAAAAGAG
 GCCTTGACATATTTGACTCCAAAGCTACTTGGTTATGCATGAAGCCATCTGGGGAGGGG
 AAGGAGGAGGGAGAAGTCTCTGAGGACCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTCA
 GTTTCTATGGAGATTCATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAAACCCAG
 AAGCTTTAAACGCGTAGGAAAGACAGGGGAATGGCCAGAATCTTCTAGCCAATTGAGTA
 GTGCTTTCAAGGAGAAATCAAGAGAAAACACTACTTCTTGGATATTTTGGCTAAGTAGT

30

40

50

CATTGGAAGTACAGTTGACTGGTTATTTTATTTTAAATCATATCTCATAGACTCTTCCCA
 ATCATAGGCTGGCTGTGTAGTTTTCTGAATTTTGCTCTGGTATTCTTCTTTTTTTTT
 TTTATTTTTATTTTTATTTTTTTTTTTGAGACTCCAGGCTGGAGTGCAGTGTACGATCT
 TGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCGAGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGA
 GTTGTGGGACTACAGGCGCCTGTCAACACGCCCGGCTAATTTTTTTGTATTTAATAGA
 GACGGGATTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCTAACTCCTGACCTCAAGTGATCCGC
 CAGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACGGGCATGAGCCACTGCGCCTGGACTTAT
 TATTCTTAATAGTATTTTATCTTATGAGCGAAGATAAGAGCCCAAGATGGTTTAGTTTA
 CTGATTCTGCAAGTGCTATTTCTATTAATTCCTTGGCATACTGCAGTTTGTATGATGGCT
 GCACTCTTGTTAATAAGCTTCGTCTTTCTGAATTCTGTTGCTCCATAGGGAGCTGGGAG
 GCTGCAAAAGGTGGCCCTGTAAAATCTTTGCATTTATAATTTAATAATTACAGACCCC
 AGTGGGACAATGTTTGAAAAATTATATTCACCGTCTAGGAAATTGGGAACTGAAAGTCC
 AATATCTGCCTCAGTGGAGTTCTGGCACCTGCATTATCCCTTCTGGGTATATCAAGATC
 AACAGCTGCACAGATACTTTTGCTTTTCACAGATTCTACACATATCATATAAAGGTGAA
 TAGTGTAAGCTACCTCTACACCTTACCAAGCACACAGGGGGCCCTGAGAAAACCTCC
 AGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTG
 GACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGA
 AAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGG
 GGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTC
 TTGTTTTGTCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCT
 CTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGT
 GTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGT
 CTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTG
 TCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCT
 TTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGA
 CAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAG
 AAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAGGGAACTGAGTGGCTGTGAAA
 GGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGGCC
 ACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCCGAGCT
 GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
 CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGG
 CCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCA
 CATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCA
 CCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC
 GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT
 CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACA
 AGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC
 GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCT
 GCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGC
 GCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGAC
 GAGCTGTACAAGTAA

10

20

30

40

DBCA.BTKp.GFP (配列番号37)

TTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCCC
 TGTGTGCTTGGTAAGGTGTAGAGGTAGCTTTACACTATTACCTTTATATGATATGTGT
 AGAATCTGTGAAAAGCAAAAGTATCTGTGCAGCTGTTGATCTTGATATACCCAGAAGGG
 ATAATGCAGGTGCCAGAACTCCACTGAGGCAGATATTGGACTTTCAGTTCCCAATTTCC
 TAGACGGTGAATATAATTTTTCAAACATTGTCCCACTGGGGTCTGTAATTATTAATTA
 TAAATGCAAAGATTTTTACAGGGCCACCTTTTGCAGCCTCCAGCTCCCTATGGAGCAA
 CAGAATTCAGAAAGACGAAGCTTATTAACAAGAGTGCAGCCATCATACAAACTGCAGTA
 TGCCAAGGAATTAATAGAAATAGCACTTGCAGAATCAGTAACTAAACCATCTTGGGCT

50

CTTATCTTCGCTCATAAGATAAAATACTATTAAGAATAATAAGTCCAGGCGCAGTGGCT
 CATGCCCGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCTGGCGGATCACTTGAGGTCAGGA
 GTTAGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAATCCCGTCTCTATTAAAATACAAAAAATT
 AGCCGGGCGTGGTGACAGGCGCCTGTAGTCCCAGCAACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGA
 ATCGCTTGAACCTCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCGTGACACTGCACTCCA
 GCCTGGAGTCTCAAAAAAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAAAAAAAGAAGAAGT
 ACCAGAGCAAATTCAGAAAACACACAGCCAGCCTATGATTGGGAAGAGTCTATGAGA
 TATGATTTAAAATAAAATAACCAGTCAACTGTACTTCAAATGACTACTTAGCCAAAATA
 TCCAAGAAGTAGTGTCTTTCTTTGATTTCTCCTTGAAAGCACTACTCAATTGGCTAGGA
 AGATTCTGGCCATTCCCTGTCTTTCTACGCGTTTAAAGCTTCTGGGTTTCCAATGCTCT
 CAGATTGCCCTCAGCCACTGCACATGAATCTCCATAGAACTGAAAGTCACACGTGGCC
 CAATTGTTTCAGGGTCTCAGAGGAGTTCTCCCTCCTCCTTCCCCTCCCAGATGGCTTC
 ATGCATAACCAAGTAGCTTTGGAGTCAAATATGTCAAGGCCTTTTTCTAGCTTCTTGC
 TGAGCACTGTGTCACTGAAAATTCTAGTTCTTCTTATTTTCAGTAGTTAGCAATCAGA
 TCTCAGCAATCAGATCATTGTGGGTGTAGAAGGGGGTATCTGATAACTCTTTGGAGAAC
 GCCCAAACCTTTGGTTTTCGAAAGCTGTATCTTCCCTTTATACCTAAGTCACTTCTGATA
 TGGGTCTAGTCCACTGAAAGGAACTCTATAGGAAATTTGCTCAAATGGAAATAGCAA
 TCATAGTGATAATTTAAAATTGCACCAATCCCCATAACTGGATGGAAAGTTACATTAG
 TTCGCACCATAAGGAGTTTACAAAGAATTCACGCGTGGATCCGAGGAAAGGAAAGGAGA
 AATAATGAAGACAAGAGAAAAGCAAGCCATGCACATGGAGGGCAATGGTAAGAGGAGA
 AACCTTTGCCACAACCTCAAGGGTGGCCGCACTGTCTGGGCTGAGGCAGAGGCTGCTT
 TCTCCTGGCCCAGTCTTTTACCCATTGTTACCACGAGGTTGGCACAGCTTCCACACAGT
 CCTTTAATAAGCCAGCTCTGACCCTGGCGACATTTGGCCTGGTACAGCTCAAGGCAGGT
 AGCCTACACCCTGGCCTAGCCAGGCCTTTCCCTAGCTCACAAAGGTCAACTTCATAACG
 TGGAGCGTGAGCTTTTACCATGTTCTCAGAGAATCTGCCTCTTAGTATTTCTTTTTCTAA
 AGGCTTCATTGACCCATGTATCCCTATTGAGTCTTCAAGCACTATTTGACAGAAGGGCT
 TGTTTTTATCTGACTGCTCCCTGCAATATTACTTTTTCCACTAAGTTTGCCAGAGGTACCC
 CTTTCTAACATTTGCTACCTGTTCCGGATGGTCACCTCATGTACATTTTTCTTCTCCTGT
 TCCGCCACCCTCAGCCCTTGTGCGAAAGGACCCTTTCCGGCCTCTCTAATCACCAGAAG
 GGACTGCCAGGGCCTTGTGCTGATGACACTCCACCCCTCCGTCAGCCTCCTCCACTAGC
 TGATAAATGGCACCAGCCATGCTGTCTCTCTGGTTTTTAGGGGTCCCAAGCAAGGTACA
 TTGCTGCTGCTGCCAGCCCCTGCCATACCCAGGGATCCGGGCCCTGAGAAAACCTC
 CAGGCTTCAAGTGACATACTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGT
 GGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAG
 AAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAG
 GGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGT
 CTTGTTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCC
 TCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTG
 TGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAAGCCCTCTCCCTGTGCTGACTG
 TCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCT
 GTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTT
 CTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGG
 ACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAA
 GAAAAAAGACATTGGTTTTAGGTGAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAA
 AGGGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTCCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGGC
 CACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGC
 TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC
 ACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTG
 GCCCACCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTACGCCGCTACCCCGACC
 ACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC

10

20

30

40

50

ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGG
 CGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA
 TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGAC
 AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG
 CGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGC
 TGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
 CGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGA
 CGAGCTGTACAAGTAA

AB.BTKp.GFP (配列番号38)

TTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCGG 10
 ATCCCTGGGGTATGGCAGGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCT
 AAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCATTTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGACGG
 AGGGTGGGAGTGTTCATCAGCACAAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTGATTAGAGAGGCC
 GAAAGGGTCTTTCCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGAC
 ATGAGGTGACCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGCAAACCTTA
 GTGGAAAAGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAACAAGCCCTTCTGTCAAATAGT
 GCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAATGAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAA
 GAGGCAGATTCTCTGAGAACATGGTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTT
 TGTGAGCTAGGGAAAGGCCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTAC
 CAGGCCAAATGTCGCCAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAAGGACTGTGTGGAAGCTGTGC 20
 CAACCTCGTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGCAGCCTCTGCCTCAG
 CCCAGACAGTGCGGCCAACCCCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTTCTCCTCTTACCATTGCC
 CTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTGTCTTCATTATTTCTCCTTTCTTTCTCGGA
 TCCACGCGTGAATCTTTGTAAACTCCTTATGGTGCGAACATAATGTAACCTTCCATCCA
 GTTATGGGGGATTGGTGCAATTTTAAATTATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGC
 AAATTTCTATAGAGTTTCTTTTCTTCTAGTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGAAGT
 ATAAAGGGAAGATACAGCTTTTCAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCAAAGAGTTATCA
 GATACCCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGATTGCTAACTACTGA
 AAATAAGGAAGAACTAGAATTTTCAAGTACACAGTGTCTCAGCAAGAAGCTAGAAAAGAG
 GCCTTGACATATTTGACTCCAAAGCTACTTGGTTATGCATGAAGCCATCTGGGGAGGGG 30
 AAGGAGGAGGGAGAAGTCTCTGAGGACCCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTCA
 GTTTCTATGGAGATTCATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAAACCCAG
 AAGCTTTAAACGCGTAGGGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAG
 TCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGA
 GGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTAT
 TTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAATGCTTTCTTAGAAAA
 TGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGCTTTTGGGGTCCCT
 TCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACT
 CGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCT
 CCTCTTTCTGTAAAGCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTT 40
 GTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTA
 GAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAG
 TAGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGG
 ACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGTTTTAGGT
 CAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTC
 CTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
 GCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACA
 AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAG
 TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGAC
 CTACGGCGTGCAGTGCTTACAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCA 50

AGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGC
 AACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGA
 GCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA
 ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG
 AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCA
 GCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCA
 CCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAG
 TTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

A.BTKp.GFP (配列番号39)

TTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCGG
 ATCCCTGGGGTATGGCAGGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCT
 AAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCATTTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGACGG
 AGGGTGGGAGTGTTCATCAGCACAAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTGATTAGAGAGGCC
 GAAAGGGTCTTTCCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGAC
 ATGAGGTGACCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGCAAACCTTA
 GTGGAAAAGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAACAAGCCCTTCTGTCAAATAGT
 GCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAATGAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAA
 GAGGCAGATTCTCTGAGAACATGGTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTT
 TGTGAGCTAGGGAAAGGCCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTAC
 CAGGCCAAATGTCGCCAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAAGGACTGTGTGGAAGCTGTGC
 CAACCTCGTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGCAGCCTCTGCCTCAG
 CCCAGACAGTGCGGCCAACCCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTTCTCCTCTTACCATTGCC
 CTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTGTCTTCATTATTTCTCCTTTCTTTCTCGGA
 TCCACGCGTAGGGGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCT
 TTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAA
 ATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGT
 GGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTC
 AGCACGGGGAAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTCTTGTCTTGGGGTCCCTTCACTA
 TCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAA
 ACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTCTCCTCTT
 TCCTGTAAGCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCT
 TTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCT
 CAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGT
 CAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCA
 GCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAA
 GCAAAAAAAGGGAACTGAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCTTCTCT
 CTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT
 CACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCA
 GCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC
 TGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGG
 CGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG
 CCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC
 AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA
 GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACA
 ACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTC
 AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA
 CACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGT
 CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
 ACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

10

20

30

40

B.BTKp.GFP (配列番号40)

50

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCGG
 ATCCACGCGTGAATTCTTTGTAAACTCCTTATGGTGCGAACATAATGTAACCTTTCCATCC
 AGTTATGGGGGATTGGTGCATTTTAAATTATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAG
 CAAATTTCCATATAGAGTTTCTTTTCAGTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTAGG
 TATAAAGGGAAGATACAGCTTTTCGAAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCCAAAGAGTTATC
 AGATACCCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGATTGCTAACTACTG
 AAAATAAGGAAGAATAAGATTTTTCAGTGACACAGTGCTCAGCAAGAAGCTAGAAAAGA
 GGCCTTGACATATTTGACTCCAAAGCTACTTGGTTATGCATGAAGCCATCTGGGGAGGG
 GAAGGAGGAGGGAGAACTCCTCTGAGGACCCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTC
 AGTTTCTATGGAGATTCATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAAACCCA
 GAAGCTTTAAACGCGTAGGGGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTA
 GTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTG
 AGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTA
 TTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAA
 ATGACTCAGCACGGGGAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTGTCTTTGGGGTCCC
 TTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCGGAGGACAGGAGAC
 TCGAAAACGCTCTTCCCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCCAGCATCTC
 TCCTCTTTCTGTAAAGCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGT
 TGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCT
 AGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATA
 GTAGTGTGAGAGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGG
 GACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGG
 TCAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTGTGCTCAGACTGT
 CCTTCCCTCTCTGGACTGTAAGAATTAAGTCTCGAGGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
 AGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCAC
 AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAA
 GTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGA
 CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTC
 AAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGG
 CAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG
 AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC
 AACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGT
 GAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC
 AGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGC
 ACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGA
 GTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

10

20

30

0.7UCOE.AB.BTKp.coBTK (配列番号41)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCGG
 TGTGGCATCTGAAGCACCACCAGCGAGCGAGAGCTAGAGAGAAGGAAAGCCACCGACTT
 CACCGCCTCCGAGCTGCTCCGGGTGCGGGTCTGCAGCGTCTCCGGCCCTCCGCGCCTA
 CAGCTCAAGCCACATCCGAAGGGGGAGGGAGCCGGGAGCTGCGCGCGGGGCGCCGGGG
 GGAGGGGTGGCACCGCCACGCCGGGCGGCCACGAAGGGCGGGGAGCGGGCGCGCGCC
 CGGCGGGGGGAGGGGCGCGCCGCGCCCGCTGGGAATTGGGGCCCTAGGGGGAGGGC
 GGAGGCGCCGACGACCGCGGCACTTACCGTTTCGCGGCGTGGCGCCCGGTGGTCCCAAG
 GGGAGGGAAGGGGGAGGGCGGGGCGAGGACAGTGACCGGAGTCTCCTCAGCGGTGGCTTT
 TCTGCTTGGCAGCCTCAGCGGCTGGCGCCAAAACCGGACTCCGCCACTTCTCGCCCC
 TGCGGTGCGAGGGTGTGGAATCCTCCAGACGCTGGGGGAGGGGGAGTTGGGAGCTTAA
 AACTAGTACCCCTTTGGGACCACTTTCAGCAGCGAACTCTCCTGTACACCAGGGGTCAG
 TTCCACAGACGCGGGCCAGGGGTGGGTGATTGCGGCGTGAACAATAATTTGACTAGAAG
 TTGATTCGGGTGTTTGGGGCCCTGGGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTA

40

50

CCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCATTTATCAGCTA
 GTGGAGGAGGCTGACGGAGGGTGGGAGTGTATCAGCACAAGGCCCTGGCAGTCCCTTC
 TGGTGATTAGAGAGGCCGAAAGGGTCCTTTCCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAG
 GAAGAGAAAAATGTGACATGAGGTGACCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGG
 TACCTCTGGCAAACCTTAGTGGAAGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAAACAAG
 CCCTTCTGTCAAATAGTGCTTGAAGACTCAATAGGGATACATGGGTCAATGAAGCCTTT
 AGAAAAAGAAATACTAAGAGGCAGATTCTCTGAGAACATGGTAAAAGCTCACGCTCCAC
 GTTATGAAGTTGACCTTTGTGAGCTAGGGAAAGGCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTA
 CCTGCCTTGAGCTGTACCAGGCCAAATGTCGCCAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAGGA
 CTGTGTGGAAGCTGTGCCAACCTCGTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAA
 AGCAGCCTCTGCCTCAGCCAGACAGTGCGGCCAACCCCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTT
 CTCTCTTACCATTGCCCTCCATGTGCATGGCTTGCTTTTCTCTTGTCTTCATTATTTCT
 CCTTTCCTTTCCTCGGATCCACGCGTGAATTCTTTGTAAACTCCTTATGGTGCGAACTAA
 TGTAACCTTCCATCCAGTTATGGGGGATTGGTGCAATTTTAAATTATCACTATGATTTG
 CTATTTCCATTTGAGCAAATTTCTATAGAGTTTCTTTTCAGTGGACTAGACCCATATC
 AGGAAGTGACTTAGGTATAAAGGGAAGATACAGCTTTCGAAAACCAAAGTTTGGGCGTT
 CTCCAAAGAGTTATCAGATACCCCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCT
 GATTGCTAACTACTGAAAATAAGGAAGAACTAGAATTTTCAGTGACACAGTGCTCAGCA
 AGAAGCTAGAAAAGAGGCCTTGACATATTTGACTCCAAAGCTACTTGGTTATGCATGAA
 GCCATCTGGGGAGGGGAAGGAGGAGGAGAAGTCTCTGAGGACCCTGAAACAATTGGG
 CCACGTGTGACTTTCAGTTTCTATGGAGATTCATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAG
 AGCATTGGAAACCCAGAAGCTTTAAGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACA
 TACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAA
 TCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCA
 CAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCT
 TAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAAGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTTGTCCTTTG
 GGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGAC
 AGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCC
 AGCATCTCTCCTCTTTCTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTT
 AGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAG
 CCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGAC
 TCAAGATAGTAGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTG
 GAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATT
 GTTTTAGGTGAGGAAGCAAAAAAAGGGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGT
 CAGACTGTCCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGC
 CGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTCCTGAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTCTC
 CCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCTGCTGACAGTGCACAAGCTGTCTTACTATGAG
 TACGACTTTGAGCGGGGCCGCGAGGATCAAAAAAGGGGAGCATCGATGTGGAGAAGAT
 TACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATCCACCCCTGAGAGGCAGATCCCAA
 GACGGGGCGAGGAGTCTCTGAGATGGAGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCCCTAT
 CCTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCT
 GAGAAAGAGGGTGGATTACCACTGGAAGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG
 AGAAGTATCACCTTGTGTTTGGATCGACGGGCAGTACCTGTGCTGTTCCCAGACAGCT
 AAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATCGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAG
 TTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCCCTGCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGA
 AAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAACTGAAAAG
 GTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAAAGGG
 CGACGAGTATTTCAATTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTGGTGGAGGGCCAGAGATAAGA
 ACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGACCGAGGCTGAGGACTCTATTGAG
 ATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCA

10

20

30

40

50

GGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTATCGTGCGCGATTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTG
 TGTCAGTGTTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGGCGTGATCAGACACTATGTGGTG
 GTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAGTACAATCCC
 AGAGCTGATTAACACCACCAGCACAATTCTGCCGGCCTGATCAGCAGGCTGAAGTATC
 CCGTCTCCCAGCAGAACAATAATGCTCCTTCTACCGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGG
 GAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTCTGAAGGAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCGT
 GGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGCAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGG
 GCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTGTCCCAC
 GAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAGCGGCCCATTTTTATCATTAC
 AGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTGCGCGAGATGAGACACAGATTCC
 AGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAG
 TCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGG
 CGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGACTGTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACACCA
 GCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCTGTGAGATGGTCTCCACCCGAGGTGCTGATGTATAGC
 AAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTGCTGATGTGGGAAATCTACAG
 CCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTCAAAATTCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCC
 AGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATCTGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTAC
 AGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACGAGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACAT
 TCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

10

AB.BTKp.coBTK (配列番号42)

20

TTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCTG
 GGGTATGGCAGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACC
 AGAGAGACAGCATGGCTGGTGCCATTTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGACGGAGGGTGG
 GAGTGTCAATCAGCACAAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTGATTAGAGAGGCCGAAAGGG
 TCCTTTCCGACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGACATGAGGT
 GACCATCCGAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGCAAACCTTAGTGAAAA
 AGTAATATTGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAACAAGCCCTTCTGTCAAATAGTGCTTGAA
 GACTCAATAGGGATACATGGGTCAATGAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAAGAGGCAG
 ATTCTCTGAGAACATGGTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTTTGTGAGC
 TAGGGAAAGGCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTACCAGGCCA
 AATGTCGCCAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAGGACTGTGTGGAAGCTGTGCCAACCTC
 GTGGTAACAATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGCAGCCTCTGCCTCAGCCCAGAC
 AGTGCGGCCAACCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTTCTCCTCTTACCATTGCCCTCCATG
 TGCATGGCTTGCTTTTCTCTTGTCTTCATTATTTCTCCTTTTCTTTTCTCGGATCCACGC
 GTGAATTCTTTGTAAACTCCTTATGGTGCGAACATAATGTAACCTTTCCATCCAGTTATGG
 GGGATTGGTGCAATTTTAAATTATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGCAAATTTT
 CTATAGAGTTTCTTTTCTTTCAGTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTAGGTATAAAGG
 GAAGATACAGCTTTTCAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCAAAGAGTTATCAGATACCC
 CCTTCTACACCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGATTGCTAACTACTGAAAATAAG
 GAAGAAGTAGAATTTTTCAGTGACACAGTGCTCAGCAAGAAGCTAGAAAAGAGGCCCTTGA
 CATATTTGACTCCAAAGCTACTTTGGTTATGCATGAAGCCATCTGGGGAGGGGAAGGAGG
 AGGGAGAAGTCTCTGAGGACCCCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTTCAGTTTCTA
 TGGAGATTCATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAAACCCAGAAGCTTT
 AAGGCCCTGAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTT
 ACAGGACTCAAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATG
 GAGAAAGTCAACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATAT
 TCCGACATTTTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAAATGACTCAGCACGGGGA
 AGTCTTGTCTCTACCTCTGTCTTGTGTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAA
 CTGTGTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCC
 TGGCCAGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTTTTCTGTAAGC

30

40

50

CCCTCTCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGG
 GAGGATAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCC
 AGTCATGTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGTCAGAGGTCCC
 AAGCAAATGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGAAATAGGGACGGCAGCAGGGAACC
 AGATAGCATGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAG
 GGAAGTGAAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTCCTTCTCTCTGGACTG
 TAAGAATTAGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTC
 CTGAAGAGGTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTT
 CCTGCTGACAGTGCACAAGCTGTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCGCCGAG
 GATCAAAAAAGGGGAGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCT 10
 GAAAAGAATCCACCCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCTCTGAGAT
 GGAGCAGATTAGTATCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGG
 GACCACTGTATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACCCAGCTG
 AAGAACGTGATTAGATAACAATAGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCTTGTTTTTGGAT
 CGACGGGCAGTACCTGTGCTGTTCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTC
 TGGAAAATCGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCC
 CTGCCTCCAACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGC
 TGCAGCCCCAGTCAGCACTTCCGAACTGAAAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGC
 CCATGAATGCTAACGATCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGAGTATTTTATTCTGGAAGAG
 TCTAATCTGCCTTGGTGGAGGGCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATC 20
 TAATTATGTGACCGAGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACA
 TGACACGGTCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTATC
 GTGCGCGATTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTGTCAGTGTTCGCTAAGAGCACCGG
 AGACCCCCAGGGCGTGATCAGACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACT
 ATCTGGCTGAGAAGCACCTGTTTAGTACAATCCCAGAGCTGATTAACCTACCACCAGCAC
 AATTCTGCCGGCCTGATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAACAAAAATGC
 TCCTTCTACCGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACAT
 TCCTGAAGGAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGG
 CAGTACGATGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTTCAT
 CGAGGAGGCTAAGGTCATGATGAACCTGTCCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAG 30
 TGTGCACCAAGCAGCGGCCCATTTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTG
 CTGAACTATCTGCGCGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTG
 CAAGGATGTGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACC
 TGGCTGCTCGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGA
 CTGTCAAGGTATGTGCTGGATGACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCTCTGT
 GAGATGGTCTCCACCCGAGGTGCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCT
 GGGCCTTTGGCGTGCTGATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGG
 TTCACAAATTCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACA
 TCTGGCCTCTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACG
 AGAGACCCACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGC 40
 TGA

BTKe.AB.BTKp.coBTK (配列番号43)

TTTCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCTC
 CATCACCTACTAGATATATCAGTGCAGTGAAAACCTTCGCTAAACTAACGCTATACCTAT
 ATCATGAAGTGTGTGGACTAGAGACAAGTGCATATCCTTACGGCAATTAACCTGGGAAAC
 GTCAAATAGTAACTACCACTCACCTTTTTCCGGAAAATCGGCTTAGTTTGGCCACCATA
 GCCACTCTGCTTCTGTCATAACGCCGCTTTCTGGGAAAACGAATTGGTATTTGTTAT
 AAAATACTGAAGATCAGCAAGTAAGTCTTACAGGTTTTATCTTAATTTTCGAGCAGAAA
 TATTAACGCTCAAGCCAGGCGTGGAGGGAGAGAGACCCGGACTCGTATGTTATTCTACA
 ACACAAATGTCACATTAACACCAAATTATGCGGAATCCATCTTACCCTGGGCGTACAGA 50

GAATCCTTGCCCTTCTTGTACTGTGTCACTTTATGGGGTTGGTGCTTGCCACACTTCTTA
CAGAAAGTCCGGCGGGTTTTAGGGACGTTAACCTAGTAAAGAAACAGTTCAGAACGTGC
AATGTTATTTGACCACAATGGCACAACGCCCTACCTTACCCAGCTAAAGCTGAGGCACT
CCAGGAGGACTCCTCATTACTTGTACCTCTGACTACAGGGTGGGCCAGCCCCATGTGC
TTCAAGCAGAGCTTCTCCCTCCGTCGAGCCCCAAAGAGGGAAGAGACCTCATTAATC
CACCCCGGCTAACTCTACCTCTTTGAACCCATCACTTCAATTCCTGGCCCCGTAGCCCC
GTCCCTTTAGGGTTGATCCCGGCAAGATTGGGTTGCTCTGATATATCGAGTCCACACAG
GAGCCTGGACCCATCCCGGCATAGCACGGGCGACGAAGGGGGGAAAGATTAAGCTGGA
TGTTACTCGGCCCCACCAGCAAGTCTACCATGCTTGCCTGAGCGCTATCGGCGCGGA
AAGAAAGAAACCGCGAGGCAAACGGAAGTATATAGGAGGTTCCCGATCGCACTTCTCA
TGGGAGTCGGTAGGAGCAATCATAGAGTGTAAGGCTCAGCGCAGCGCCCTCGGGCGGCT
GAGAGGACTCAGTTCGGAGCCGCGGGCGGGAGCTTAAGGAAGGACTCCGCCTAAAGGGT
GGTCCACTCACCCGACTTCTCCCGCCCCGCAGCTTTC AACGTTTCGTCACTTTATCTC
TTTTGGTGGACTCTGCTACGTAGTGGCGTTCAGTGAAGGGAGCAGTGTTTTTCCAGAT
CCTCTGGCCTCCCCGTCCCCGAGGGAAGCCAGGACTAGGGTGAATGAAGGGTCTCTCC
ACCTCCACGTTCCATTCTGTTCCACCTCAAGGTCAGTGGGAACACCTTTCGCAGCAA
CTGCTAATTCAATGAAGACCTGGAGGGAGCCAATTGTTCCAGTTCATCTATCACATGGC
CAGTTGGTCCATTCAACAAATGGTTATTGGATGCCATTATGTGGCAGGCACTGTTCCG
GGGGAGAGGTACAGTAATCTAATAGGCTTATAAATGTGCAATTATGAACTAAGTACTTT
GAAGAAAAGGAACAATGATTGGCATTAAAGCAGCACCTTCTGTTGAGGGAGTAAGTCA
GCAGCTCTAGGTTCTGAAAAGTGACAATGAAATTGTTTGGCTCCTGTCTGGGGTATGGC
AGGGGCTGGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGAGACA
GCATGGCTGGTGCCATTTATCAGCTAGTGGAGGAGGCTGACGGAGGGTGGGAGTGTGAT
CAGCACAAGGCCCTGGCAGTCCCTTCTGGTGATTAGAGAGGCCGAAAGGGTCTTTCCG
ACAAGGGCTGAGGGTGGGCGGAACAGGAAGAGAAAAATGTGACATGAGGTGACCATCC
GAACAGGTAGCAAATGTTAGAAAGGGGTACCTCTGGCAAACCTTAGTGGAAGTAATAT
TGCAGGGAGCAGTCAGATAAAAACAAGCCCTTCTGTCAAATAGTGCTTGAAGACTCAAT
AGGGATACATGGGTCAATGAAGCCTTTAGAAAAAGAAATACTAAGAGGCAGATTCTCTG
AGAACATGGTAAAAGCTCACGCTCCACGTTATGAAGTTGACCTTTGTGAGCTAGGGAAA
GGCCTGGCTAGGCCAGGGTGTAGGCTACCTGCCTTGAGCTGTACCAGGCCAAATGTCGC
CAGGGTCAGAGCTGGCTTATTAAGGACTGTGTGGAAGCTGTGCCAACCTCGTGGTAAC
AATGGGTAAAAGACTGGGCCAGGAGAAAGCAGCCTCTGCCTCAGCCAGACAGTGGGGC
CAACCCTTGAGGTTGTGGCAAAGGTTTCTCCTCTTACCATTGCCCTCCATGTGCATGGC
TTGCTTTTCTCTTGTCTTCAATATTTCTCCTTTCTTTCTCGGATCCACGCGTGAATTC
TTTGTAAACTCCTTATGGTGCGAATAATGTAACCTTTCCATCCAGTTATGGGGGATTGG
TGCAATTTTAAATTATCACTATGATTTGCTATTTCCATTTGAGCAAATTTCTATAGAGT
TTCCTTTAGTGGACTAGACCCATATCAGGAAGTGACTTAGGTATAAAGGGAAGATACA
GTTTTGAAAACCAAAGTTTGGGCGTTCTCCAAGAGTTATCAGATACCCCTTCTACA
CCCACAATGATCTGATTGCTGAGATCTGATTGCTAACTACTGAAAATAAGGAAGAACTA
GAATTTTCAAGTGACACAGTGCTCAGCAAGAAGCTAGAAAAGAGGCCTTGACATATTTGA
CTCCAAAGCTACTTGGTTATGCATGAAGCCATCTGGGGAGGGGAAGGAGGGAGGAGAAC
TCCTCTGAGGACCCTGAAACAATTGGGCCACGTGTGACTTTCAGTTTCTATGGAGATTC
ATGTGCAGTGGCTGAGGGCAATCTGAGAGCATTGGAAACCCAGAAGCTTTAAGGCCCT
GAGAAAACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTC
AAGAGAAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTC
AACATCCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATT
TTTATCTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAAGTCTTGTC
TCTACCTCTGTCTTGTGTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTC
CCTGAGACTCCTCTGCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTC
TCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTTTCTGTAAAGCCCTCTCCC

10

20

30

40

50

TGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAG
 CTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGT
 TGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGTCAGAGGTCCCAAGCAAAT
 GAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGGAAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCA
 TGCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGA
 GTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATT
 AGTCTCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTCCTGAAGAG
 GTCCCAGCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCCCTGCTGA
 CAGTGCACAAGCTGTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCGCCGAGGATCAAAA
 AAGGGGAGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAA
 TCCACCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCCTCTGAGATGGAGCAGA
 TTAGTATCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTTAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTG
 TATGTGTTCTCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACCAGCTGAAGAACGT
 GATTAGATACAATAGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCCCTTGTTTTTGGATCGACGGGC
 AGTACCTGTGCTGTTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAAT
 CGGAACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCCTGCCTCC
 AACACCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTGCAGCCC
 CAGTCAGCACTTCCGAACTGAAAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAAT
 GCTAACGATCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGAGTATTTCACTTCTGGAAGAGTCTAATCT
 GCCTTGGTGGAGGGCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATG
 TGACCGAGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGG
 TCCCAGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTTATCGTGCGCGA
 TTCTAGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTGTCAGTGTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCC
 AGGGCGTGATCAGACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCT
 GAGAAGCACCTGTTTAGTACAATCCCAGAGCTGATTAACCTACCACCAGCACAACTCTGC
 CGGCCTGATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAACAATAATGCTCCTTCTA
 CCGCTGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTCCTGAAG
 GAGCTGGGAACTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGCAGTACGA
 TGTGGCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGG
 CTAAGGTGATGATGAACCTGTCCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACC
 AAGCAGCGGCCATTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTA
 TCTGCGCGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGATG
 TGTGTGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTGGCTGCT
 CGCAATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGACTGTCAAG
 GTATGTGCTGGATGACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCCTGTGAGATGGT
 CTCCACCCGAGGTGCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTT
 GCGGTGCTGATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTACAAA
 TTCCGAGACAGCTGAGCACATCGCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATCTGGCCT
 CTGAGAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACGAGAGACCC
 ACATTCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

10

20

30

40

BTKe.BTKp.coBTK (配列番号44)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCTC
 CATCACCTACTAGATATATCAGTGCAGTGAAAACCTTCGCTAAACTAACGCTATACCTAT
 ATCATGAAGTGTGTGGACTAGAGACAAGTGCATATCCTTACGGCAATTAACCTGGGAAAC
 GTCAAATAGTAACTACCACTCACCTTTTTCCGGAAAATCGGCTTAGTTTGCCACCAT
 GCCACTCTGCTTCCTGTCATAACGCCGCTTTCTGGGAAAACGAATTGGTATTTGTTAT
 AAAATACTGAAGATCAGCAAGTAAGTCTTACAGGTTTTATCTTAATTTGCGAGCAGAAA
 TATTAACGCTCAAGCCAGGCGTGGAGGGAGAGAGACCCGGACTCGTATGTTATTCTACA
 ACACAAATGTACATTAACACCAAATTATGCGGAATCCATCTTACCCTGGGCGTACAGA
 GAATCCTTGCCCTTCTTGTACTGTGTCACTTTATGGGGTTGGTGTGCTTGCCCACTTCTTA

50

CAGAAAGTCCGGCGGGTTTTAGGGACGTTAACCTAGTAAAGAAACAGTTCAGAACGTGC
 AATGTTATTTGACCACAATGGCACAACGCCCTACCTTACCCAGCTAAAGCTGAGGCACT
 CCAGGAGGACTCCTCATTACTTGCTACCTCTGACTACAGGGTGGGCCAGCCCCATGTGC
 TTCAAGCAGAGCTTCTCCCTCCGTCGAGCCCCAAAGAGGGGAAGAGACCTCATTAATC
 CACCCCCGGCTAACTCTACCTCTTTGAACCCATCACTTCAATTCCTGGCCCCGTAGCCCC
 GTCCCTTTAGGGTTGATCCCGGCAAGATTGGGTTGCTCTGATATATCGAGTCCACACAG
 GAGCCTGGACCCATCCCGGCATAGCACGGGCGACGAAGGGGGGAAAGATTAAGCTGGA
 TGTTACTCGGCCCCACCAGCAAGTCTACCATGCTTGCCTGAGCGCTATCGGCGCGGA
 AAGAAAGAAACCGCGAGGCAAACGGAAGTATATAGGAGGTTCCCGATCGCACTTCTCA
 TGGGAGTCCGTTAGGAGCAATCATAGAGTGTAAGGCTCAGCGCAGCGCCCTCGGGCGGCT
 GAGAGGACTCAGTTCGGAGCCGCGGGCGGGAGCTTAAGGAAGGACTCCGCCTAAAGGGT
 GGTCCACTCACCCCGACTTCTCCCGCCCCGCAGCTTTCAACGTTTTCGTCACTTTATCTC
 TTTTGGTGGACTCTGCTACGTAGTGGCGTTCAGTGAAGGGAGCAGTGTTTTTCCAGAT
 CCTCTGGCCTCCCCGTCCCCGAGGGAAGCCAGGACTAGGGTGAATGAAGGGGTCTCC
 ACCTCCACGTTCCATTCCTGTTCCACCTCAAGGTCAGTGGGAACACCTTTTCGCAGCAA
 CTGCTAATTCATGAAGACCTGGAGGGAGCCAATTGTTCCAGTTCATCTATCACATGGC
 CAGTTGGTCCATTCAACAAATGGTTATTGGATGCCATTATGTGGCAGGCACTGTTCCG
 GGGGAGAGGTACAGTAATCTAATAGGCTTATAAATGTGCAATTATGAACTAAGTACTTT
 GAAGAAAAGGAACAATGATTGGCATTAAAGCAGCACCTTCTGTTGAGGGGAGTAAGTCA
 GCAGCTCTAGGTTCTGAAAAGTGACAATGAAATTGTTTGGCTCCTGTGGCCCCGTGAGAA
 AACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAG
 AAAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACAT
 CCACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTAT
 CTGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAAGTCTTGTCTCTAC
 CTCTGTCTTGTGTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGA
 GACTCCTCTGCCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTT
 GCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCTCTTTCTGTAAGCCCCTCTCCCTGTGC
 TGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGA
 TGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGA
 AAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCCAAGCAAATGAAGG
 GCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTG
 CTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAGGGAACTGAGTGG
 CTGTGAAAGGGTGGGTTTTGCTCAGACTGTCCTTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTC
 TCGAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTTTCTGAAAGAGGTCC
 CAGCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTCTCTGCTGACAGT
 GCACAAGCTGTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCCGCGAGGATCAAAAAAGG
 GGAGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATCCA
 CCCCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCTCTGAGATGGAGCAGATTAG
 TATCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATG
 TGTTCTCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACCAGCTGAAGAACGTGATT
 AGATAACAATAGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCTTGTTTTTGGATCGACGGGCAGTA
 CCTGTGCTGTTCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATCGGA
 ACGGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCCCTGCCTCCAACA
 CCCGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGT
 CAGCACTTCCGAACTGAAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTA
 ACGATCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGAGTATTTCACTTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCT
 TGGTGGAGGGCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGAC
 CGAGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGGTCCC
 AGGCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTTATCGTGC GCGATTCT
 AGTAAGGCCGGCAAATACACTGTGTCAGTGTTCGCTAAGAGCACCGGAGACCCCCAGGG

10

20

30

40

50

CGTGATCAGACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGA
 AGCACCTGTTTAGTACAATCCCAGAGCTGATTAACACCACCAGCACAATTCTGCCGGC
 CTGATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCCAGCAGAACAATAATGCTCCTTCTACCGC
 TGGACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCAAAGGACCTGACATTCCTGAAGGAGC
 TGGGAACCTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGGCAGTACGATGTG
 GCCATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAA
 GGTCAATGATGAACCTGTCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGC
 AGCGGCCCATTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTG
 CGCGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGATGTGTG
 TGAGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCGGGACCTGGCTGCTCGCA
 ATTGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGTGACTTCGGACTGTCAAGGTAT
 GTGCTGGATGACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCTGTGAGATGGTCTCC
 ACCCGAGGTGCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCG
 TGCTGATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTACAAAATTCC
 GAGACAGCTGAGCACATCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCGGCCACATCTGGCCTCTGA
 GAAGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACGAGAGACCCACAT
 TCAAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

10

【 0 2 8 6 】

BTKe Myc.BTKp.coBTK (配列番号45)

TTTCCTAGGAGAATCCCTGGGGGAATCATTGCAGTTGGAGCATAATGTAGGGGGCCCT
 GTTACTCGGCCCCACCAGCAAGTCTACCATGCTTGCGTGAGCGCTATCGGCGCGGAA
 AGAAAGAAACCGCGAGGCAAACGGAAGTATATAGGAGGTTCCCGATCGCACTTCCTCAT
 GGGAGTCGGTAGGAGCAATCATAGAGTGTAAGGCTCAGCGCAGCGCCCTCGGGCGGCTG
 AGAGGACTCAGTTCGGAGCCGCGGGCGGGAGCTTAAGGAAGGACTCCGCCTAAAGGGTG
 GTCCACTCACCCCGACTTCCTCCCGCCCCGACGCTTCAACGTTTCGTCACCTTATCTCT
 TTTGGTGGACTCTGCTACGTAGTGGCGTTCAGTGAAGGGAGCAGTGTTTTTCCCAGATC
 CTCTGGCCTCCCCGTCCCCGAGGGAAGCCAGGACTAGGGTGAATGAAGGGGTCTCCA
 CCTCCACGTTCCATTCTGTTCCACCTCAAGGTCAGTGGGAACACCTTTCGCAGCAAAC
 TGCTAATTCAATGAAGACCTGGAGGGAGCCAATTGTTCCAGTTCATCTATCACATGGCC
 AGTTGGTCCATTCAACAAATGGTTATTGGATGCCATTATGTGGCAGGCACTGTTCCGG
 GGGAGAGGTACAGTAATCTAATAGGCTTATAAATGTGCAATTATGAACTAAGTACTTTG
 AAGAAAAGGAACAATGATTGGCATTAAAGCAGCACCCCTTCTGTTGAGGGAGTAAGTCAG
 CAGCTCTAGGTTCTGAAAAGTGACAATGAAATTGTTTGGCTCCTGTGGCCCTGAGAAA
 ACCTCCAGGCTTCAAGTGACATACCTAGTCTGCTTTACCGGTTTACAGGACTCAAGAGA
 AAGGTGGACATTGAGAGTTAATCCCTGAGGCCAAATCTTAAATGGAGAAAGTCAACATC
 CACAGAAAATGGGGAAGGGCACAAAGTATTTCTGTGGGCTTATATTCCGACATTTTTATC
 TGTAGGGGAAAAATGCTTTCTTAGAAAATGACTCAGCACGGGGAAAGTCTTGTCTCTACC
 TCTGTCTTGTGTTTGTCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGTGTGTCCCTGAG
 ACTCCTCTGCCCGGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTGGCCAGTCTCTTTG
 CTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCCTGTAAGCCCTCTCCCTGTGCT
 GACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGATAGCTTGAT
 GACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCATGTTGAGAA
 AGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTGAGAGGTCCTCAAGCAAATGAAGGG
 CGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCATGCTGCT
 GAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAAGGGAACTGAGTGGCT
 GTGAAAGGGTGGGGTTTGTCTCAGACTGTCCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATTAGTCTC
 GAGAAAGAAGCCACCATGGCCGCTGTGATCCTGGAGAGCATTTTCTGAAGAGGTCCCA
 GCAGAAAAAGAAAACCTCTCCCCTGAACTTTAAGAAAAGACTGTTTCTGCTGACAGTGC
 ACAAGCTGTCTTACTATGAGTACGACTTTGAGCGGGGCGCCGAGGATCAAAAAAGGGG
 AGCATCGATGTGGAGAAGATTACATGCGTGGAGACCGTGGTCCCTGAAAAGAATCCACC

20

30

40

50

CCCTGAGAGGCAGATCCCAAGACGGGGCGAGGAGTCCTCTGAGATGGAGCAGATTAGTA
 TCATTGAGCGCTTCCCCTATCCTTTTCAGGTGGTGTACGACGAGGGACCACTGTATGTG
 TTCTCACCCACAGAGGAGCTGAGAAAGAGGTGGATTACACCAGCTGAAGAACGTGATTAG
 ATACAATAGCGATCTGGTGCAGAAGTATCACCCCTTGTTTTTGGATCGACGGGCAGTACC
 TGTGCTGTTCCCAGACAGCTAAGAACGCTATGGGATGCCAGATTCTGGAAAATCGGAAC
 GGATCTCTGAAACCAGGGAGTTCACACCGCAAGACCAAAAAGCCCCTGCCTCCAACACC
 CGAGGAGGATCAGATCCTGAAAAAGCCTCTGCCACCCGAGCCTGCTGCAGCCCCAGTCA
 GCACTTCCGAACTGAAAAAGGTGGTGGCTCTGTATGACTACATGCCCATGAATGCTAAC
 GATCTGCAGCTGAGAAAGGGCGACGAGTATTTCACTTCTGGAAGAGTCTAATCTGCCTTG
 GTGGAGGGCCAGAGATAAGAACGGACAGGAGGGGTACATCCCATCTAATTATGTGACCG
 AGGCTGAGGACTCTATTGAGATGTACGAGTGGTATAGCAAGCACATGACACGGTCCCAG
 GCTGAGCAGCTGCTGAAGCAGGAGGGCAAAGAGGGAGGGTTTATCGTGC GCGATTCTAG
 TAAGGCCGGCAAATACACTGTGT CAGTGTTCGCTAAGAGCACCCGGAGACCCCCAGGGCG
 TGATCAGACACTATGTGGTGTGTTCCACACCTCAGTCTCAGTACTATCTGGCTGAGAAG
 CACCTGTTTAGTACAATCCCAGAGCTGATTA ACTACCACCAGCACAATTCTGCCGGCCT
 GATCAGCAGGCTGAAGTATCCCGTCTCCAGCAGAACAAAAATGCTCCTTCTACCGCTG
 GACTGGGGTACGGCAGTTGGGAGATTGATCCA AAGGACCTGACATTCTGAAGGAGCTG
 GGA ACTGGGCAGTTTGGCGTGGTGAAGTATGGAAAATGGAGAGGGCAGTACGATGTGGC
 CATCAAGATGATCAAGGAGGGCTCAATGAGCGAGGACGAGTTCATCGAGGAGGCTAAGG
 TCATGATGAACCTGTCCCACGAGAACTGGTGCAGCTGTATGGAGTGTGCACCAAGCAG
 CGGCCATTTTTATCATTACAGAGTACATGGCTAATGGGTGTCTGCTGAACTATCTGCG
 CGAGATGAGACACAGATTCCAGACACAGCAGCTGCTGGAAATGTGCAAGGATGTGTGTG
 AGGCTATGGAGTACCTGGAGTCTAAGCAGTTTCTGCACCCGGACCTGGCTGCTCGCAAT
 TGCCTGGTGAACGATCAGGGCGTGGTGAAGGTGAGT GACTTCGGACTGTCAAGGTATGT
 GCTGGATGACGAGTACACCAGCTCCGTGGGCTCTAAGTTTCTGTGAGATGGTCTCCAC
 CCGAGGTGCTGATGTATAGCAAGTTCTCCTCTAAGAGCGATATCTGGGCCTTTGGCGTG
 CTGATGTGGGAAATCTACAGCCTGGGCAAGATGCCTTACGAGCGGTTCACAAATTCCGA
 GACAGCTGAGCACATCGCCCAGGGCCTGCGCCTGTACCCGGCCACATCTGGCCTCTGAGA
 AGGTGTACACCATCATGTACAGCTGTTGGCACGAGAAGGCCGACGAGAGACCCACATTC
 AAGATCCTGCTGTCCAACATTCTAGATGTGATGGACGAGGAGAGCTGA

10

20

30

【 0 2 8 7 】

配列番号46 : B29プロモーター配列 :

【 0 2 8 8 】

AGGAGGGCCATCATGGCCAAGTTGACCAGTGCTGTCCCAGTGCTCACAGCCAGGGAT
 GTGGCTGGAGCTGTTGAGTTCTGGACTGACAGGTTGGGGTTCTCCAGAGATTTTGTGGA
 GGATGACTTTGCAGGTGTGGT CAGAGATGATGTCACCCTGTTTCACTCAGCAGTCCAGG
 ACCAGGTGGTGCCTGACAACACCCTGGCTTGGGTGTGGGTGAGAGGACTGGATGAGCTG
 TATGCTGAGTGGAGTGAGGTGGTCTCCACCAACTTCAGGGATGCCAGTGGCCCTGCCAT
 GACAGAGATTGGAGAGCAGCCCTGGGGGAGAGAGTTTGCCTGAGAGACCCAGCAGGCA
 ACTGTGTGCACTTTGTGGCAGAGGAGCAGGACTGA

40

【 0 2 8 9 】

当業者であれば、本明細書に記載の用語、特に添付の請求項（たとえば添付の請求項の
 本体部）に記載の用語は、通常、「オープンエンドな」用語であることを理解できるであ
 る（たとえば、「含んでいる（including）」という用語は、「含んでいるが、これら
 に限定されない」と解釈されるべきであり、「有する（having）」という用語は、「少な
 くとも有する」と解釈されるべきであり、「含む（include）」という用語は「含むが、
 これらに限定されない」と解釈されるべきである）。さらに、特定の数が請求項に記載さ
 れている場合、前述のような意図も請求項に明確に記載されており、特定の数が記載され
 ていない場合はそのような意図も存在しないことも、当業者であれば理解できるであらう
 。具体的に説明をすれば、たとえば、後述の特許請求の範囲では、請求項を定義するため

50

に、「少なくとも1つ」や「1つ以上」といった前置きが記載されている場合がある。しかしながら、このような前置きが記載されているからといって、不定冠詞「a」または「an」を使用して構成要素が記載された請求項を、1つのみの構成要素を含む実施形態に限定すべきではなく、たとえ同じ請求項内に「1つ以上」または「少なくとも1つ」といった前置きと「a」または「an」といった不定冠詞とが含まれていたとしても、1つのみの構成要素を含む実施形態に限定すべきではない(たとえば、「a」および/または「an」は、「少なくとも1つ」または「1つ以上」を意味すると解釈すべきである)。これは、定冠詞を使用して記載された請求項でも同じである。また、請求項に特定の数が明確に記載されていたとしても、「少なくとも」記載されたその数であるということを当業者であれば理解するであろう(たとえば、修飾語を伴わない「2つ」という記載は、「少なくとも2つ」または「2つ以上」を意味する)。さらに、「A、BおよびCのうちの少なくとも1つ」といった慣用語句が使用されている場合、通常、そのような語句は、当業者がその語句を通常理解する意味で記載されている(たとえば「A、BおよびCのうちの少なくとも1つを有するシステム」は、Aのみを有するシステム、Bのみを有するシステム、Cのみを有するシステム、AとBを有するシステム、AとCを有するシステム、BとCを有するシステム、ならびに/またはA、BおよびCを有するシステムなどを包含するが、これらに限定されない)。また、「A、BまたはCのうちの少なくとも1つ」といった慣用語句が使用されている場合、通常、そのような語句は、当業者がその語句を通常理解する意味で記載されている(たとえば「A、BまたはCのうちの少なくとも1つを有するシステム」は、Aのみを有するシステム、Bのみを有するシステム、Cのみを有するシステム、AとBを有するシステム、AとCを有するシステム、BとCを有するシステム、ならびに/またはA、BおよびCを有するシステムなどを包含するが、これらに限定されない)。さらに、2つ以上の選択肢を表すための選言的用語および/または選言的語句は、明細書、特許請求の範囲または図面のいずれにおいても、記載された用語のうちの1つ、記載された用語のいずれか、または記載された用語の両方を含む場合があると当業者であれば理解するであろう。たとえば「AまたはB」という表現は、「AまたはB」または「AおよびB」を含む場合がある。

【0290】

さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ形式で記載されている場合、当業者であれば、マーカッシュ形式で記載された各メンバーまたはそれらからなるサブグループについても記載されていると理解できるであろう。

10

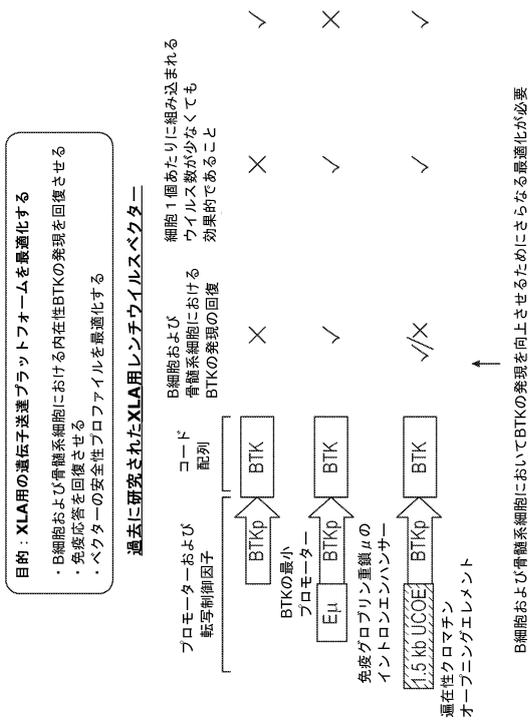
20

30

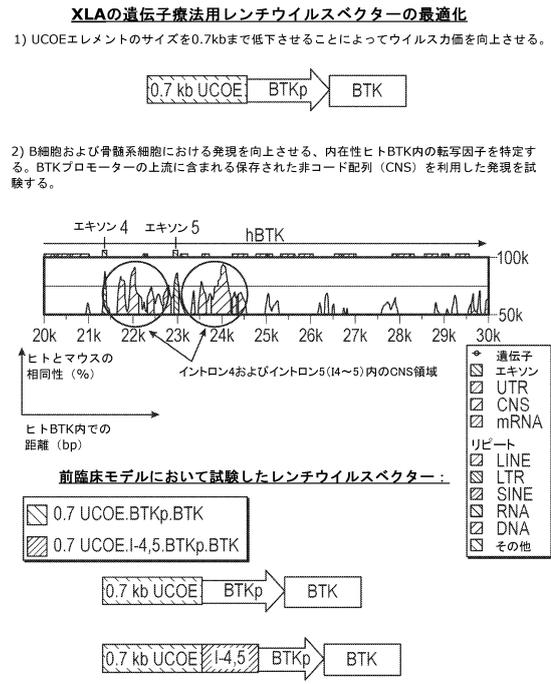
40

50

【 図 面 】
【 図 1 】

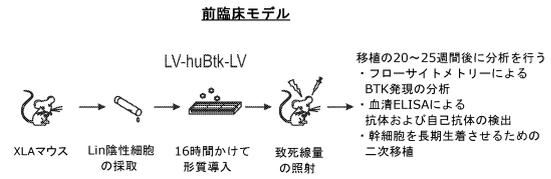


【 図 2 】

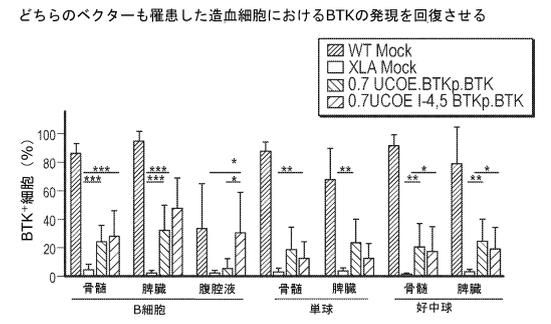


10
20

【 図 3 】

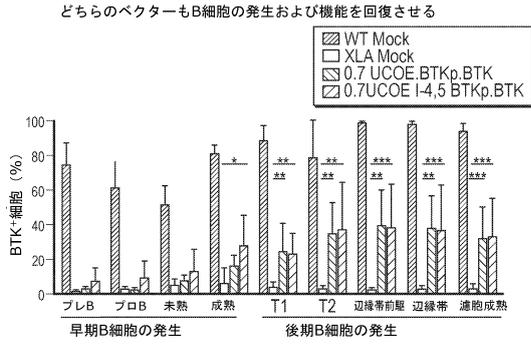


【 図 4 】

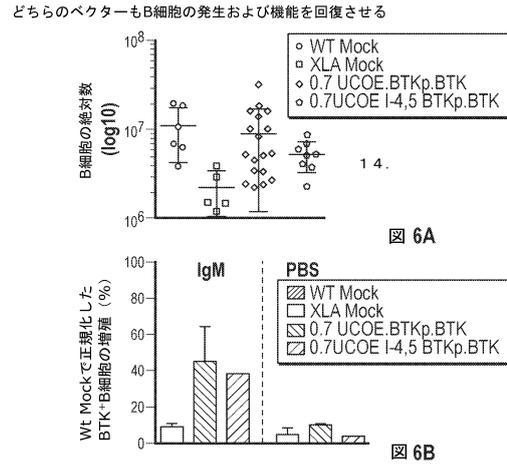


30
40

【 図 5 】

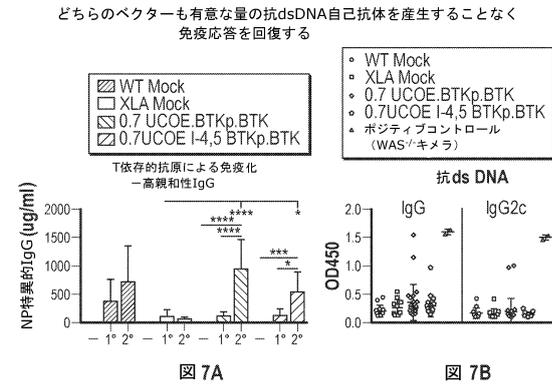


【 図 6 】

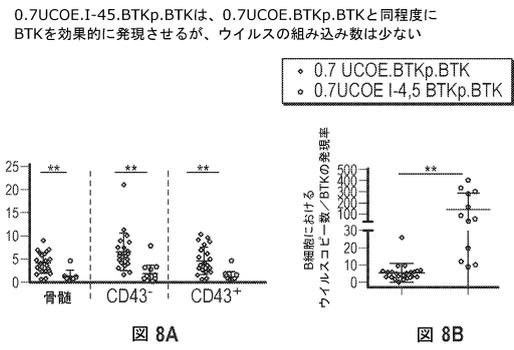


10

【 図 7 】



【 図 8 】



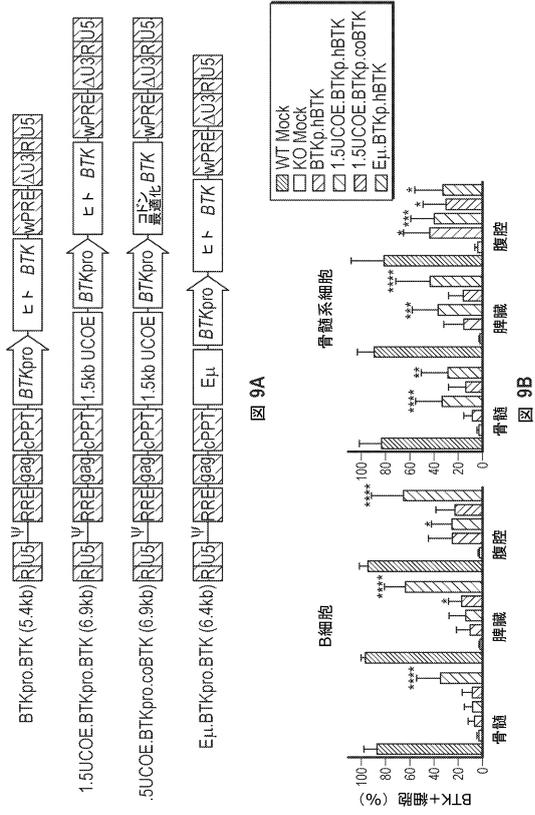
20

30

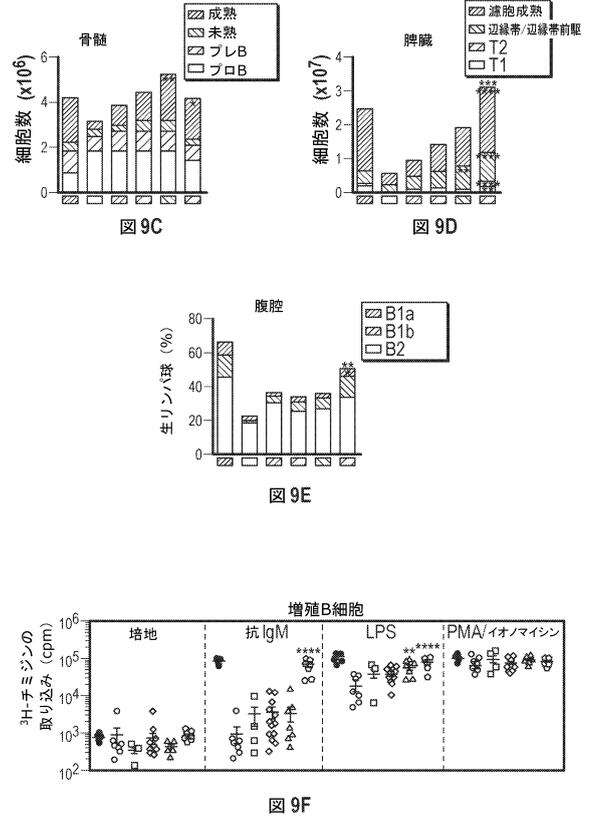
40

50

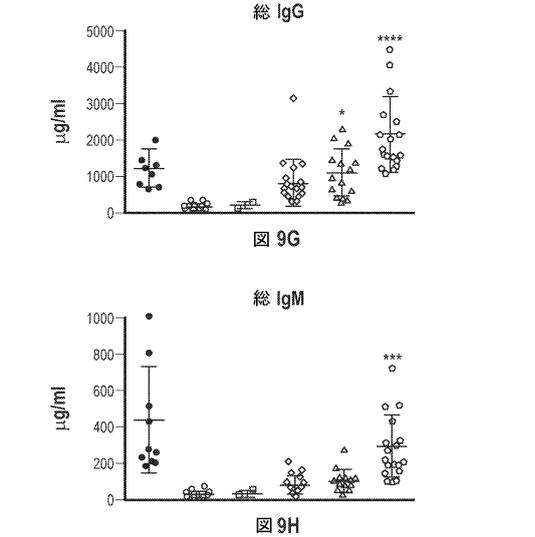
【 図 9 A - B 】



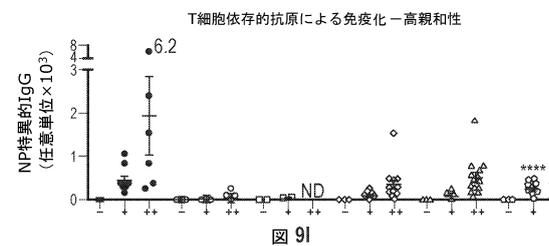
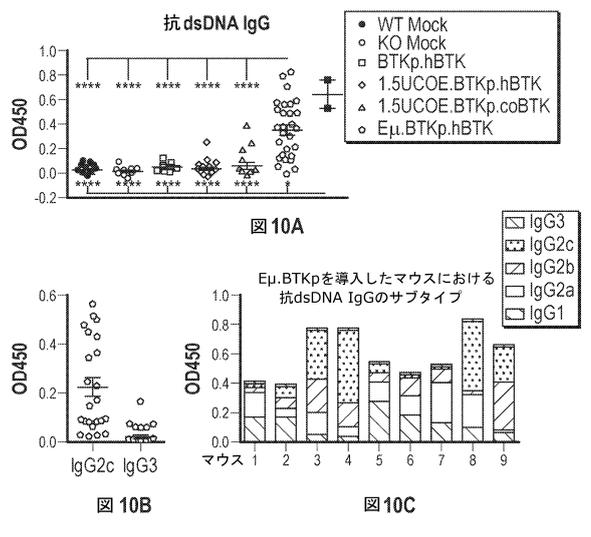
【 図 9 C - F 】



【 図 9 G - I 】



【 図 10 】



10

20

30

40

50

【 図 1 1 A 】

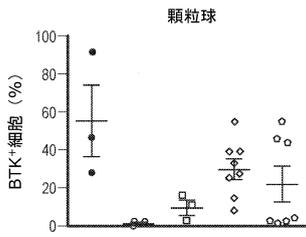


図 11A

【 図 1 1 B - D 】

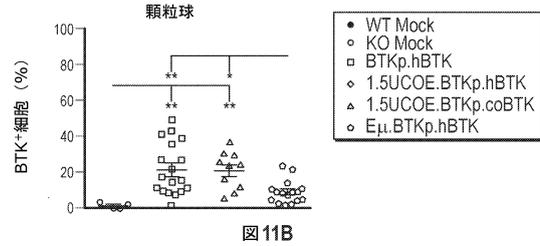


図 11B

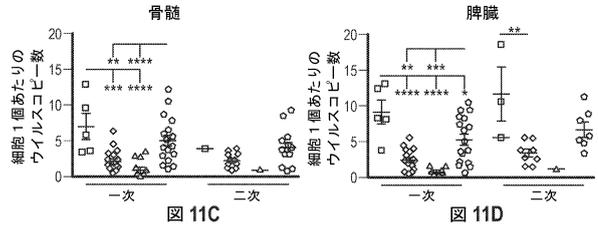


図 11C

図 11D

【 図 1 2 A - B 】

0.7UCOE.BTKpro.coBTK (6.1 kb)



図 12A

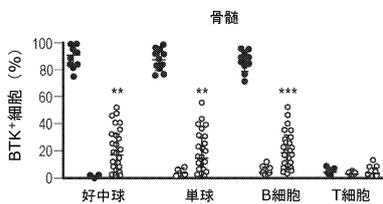


図 12B

【 図 1 2 C - D 】

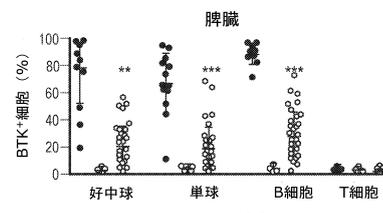


図 12C

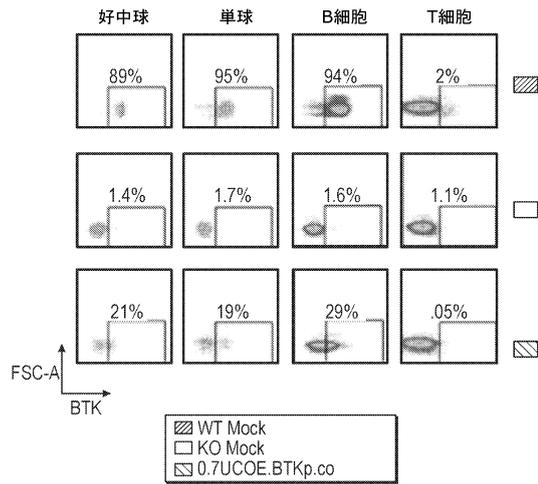


図 12D

10

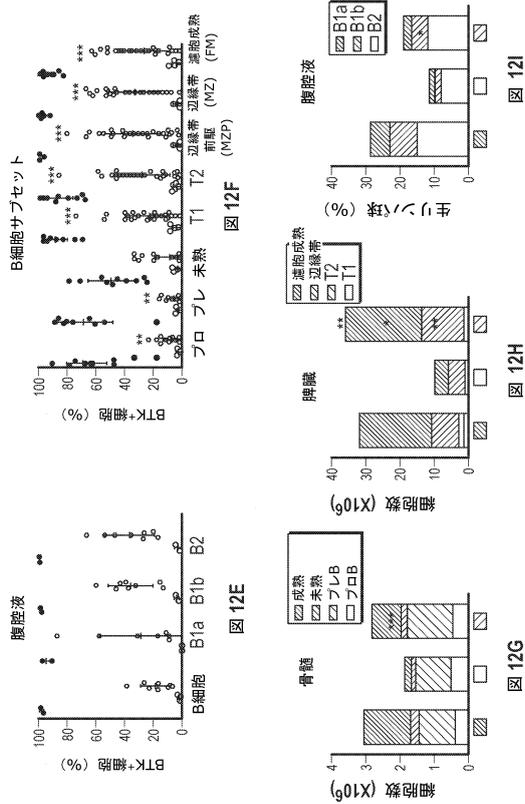
20

30

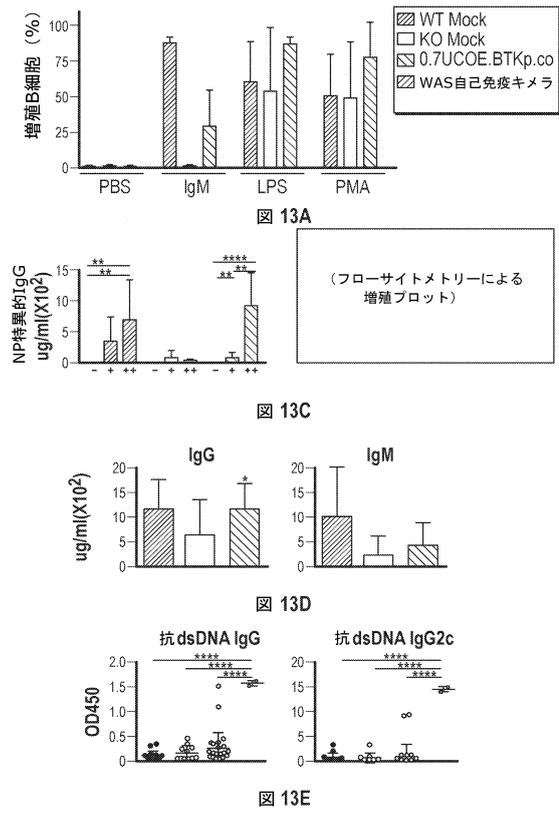
40

50

【 図 1 2 E - I 】



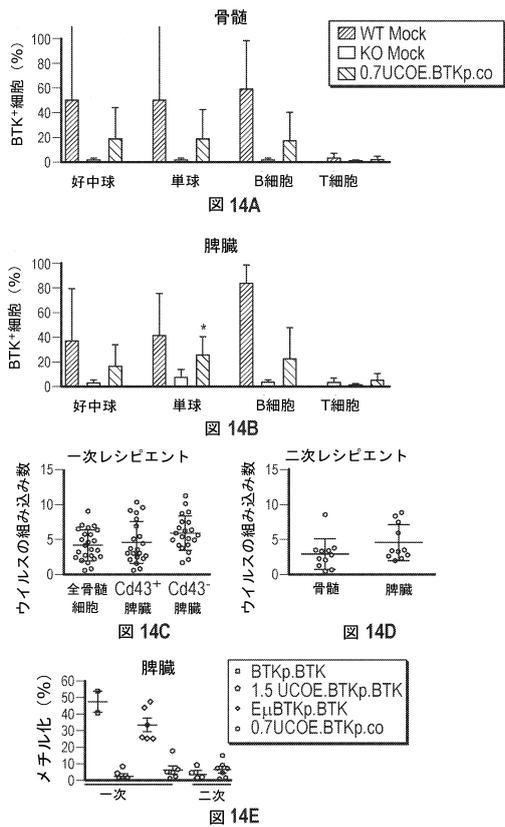
【 図 1 3 】



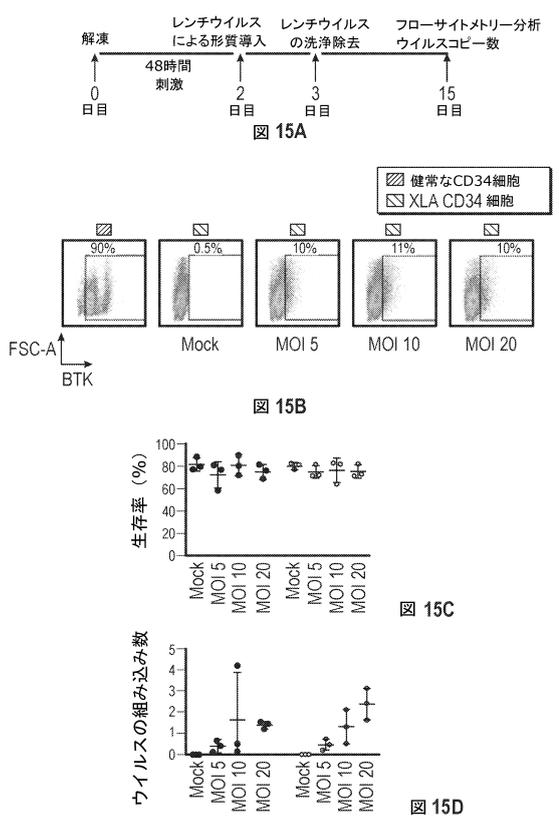
10

20

【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

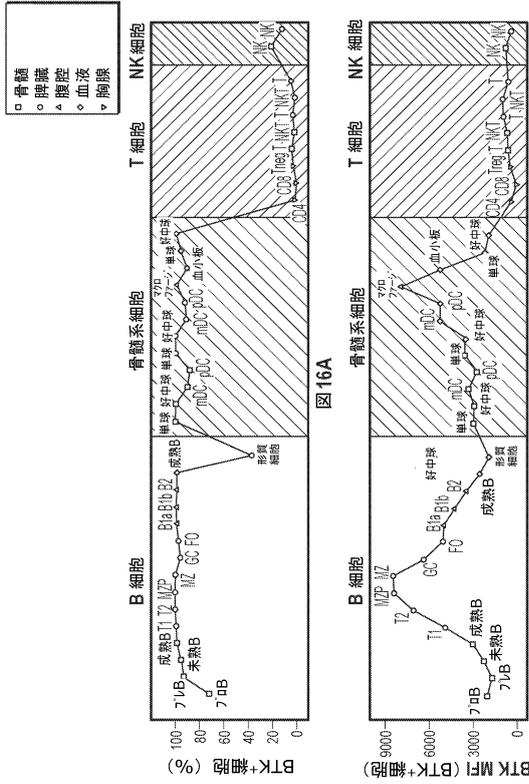


30

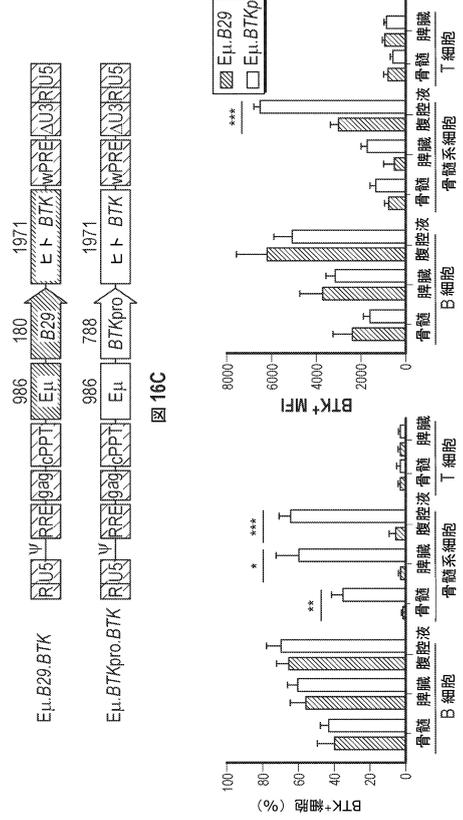
40

50

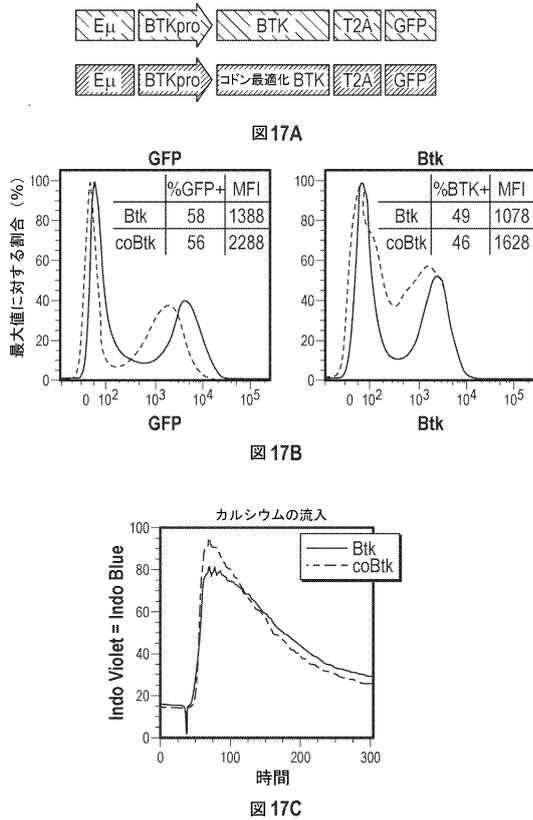
【図 16 A - B】



【図 16 C - D】



【図 17】



【図 18 A】

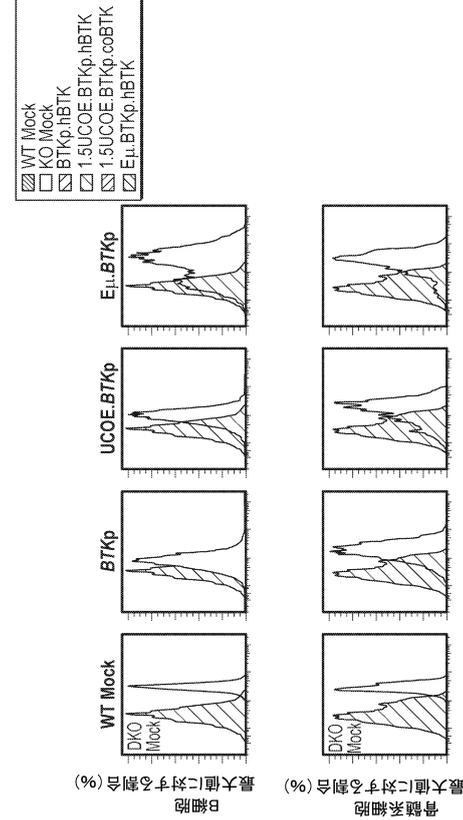


図 16E

図 16D

図 18A

10

20

30

40

50

【 図 18 B - C 】

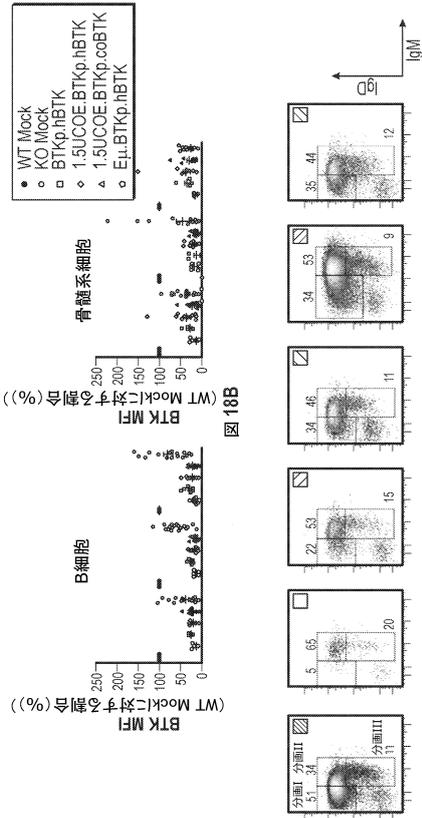


図 18B

図 18C

【 図 18 D - F 】

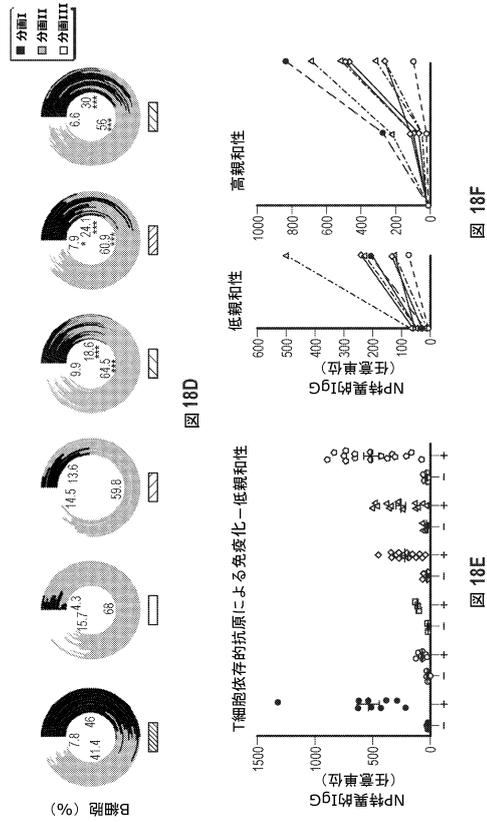


図 18D

図 18E

図 18F

【 図 18 G 】

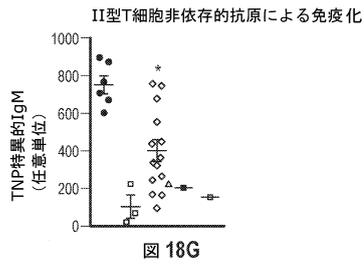


図 18G

【 図 19 】

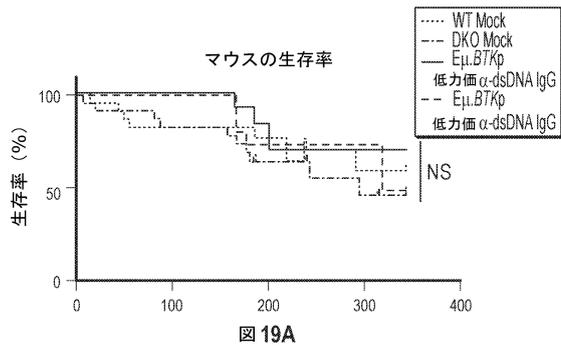


図 19A

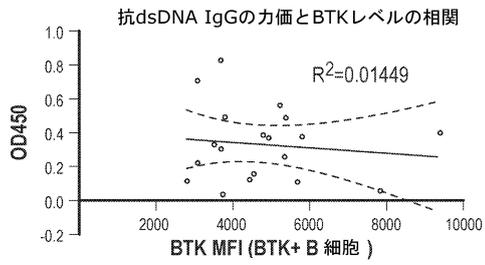


図 19B

10

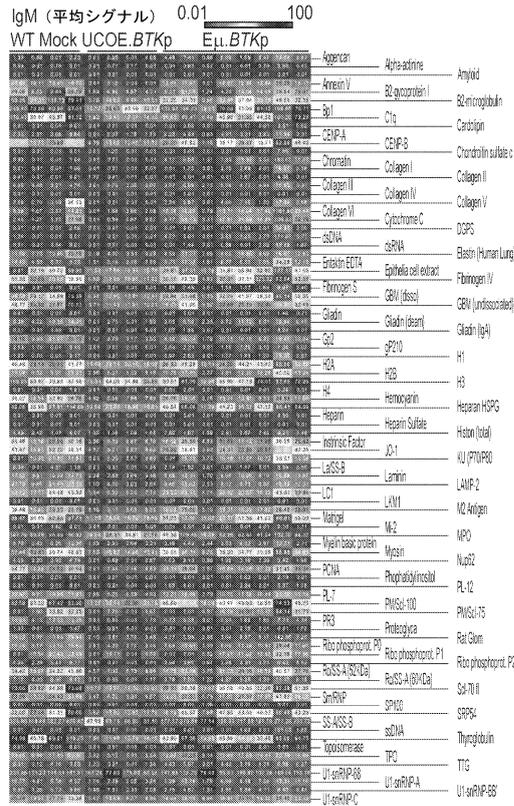
20

30

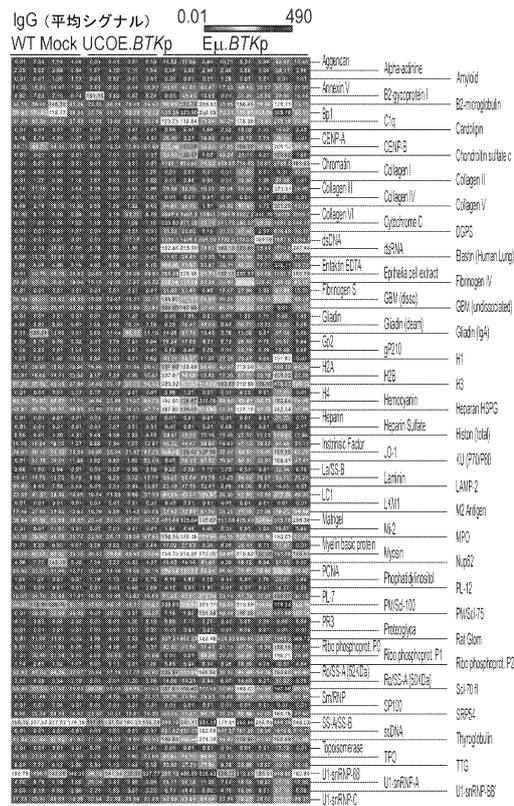
40

50

【図 20 - 1】



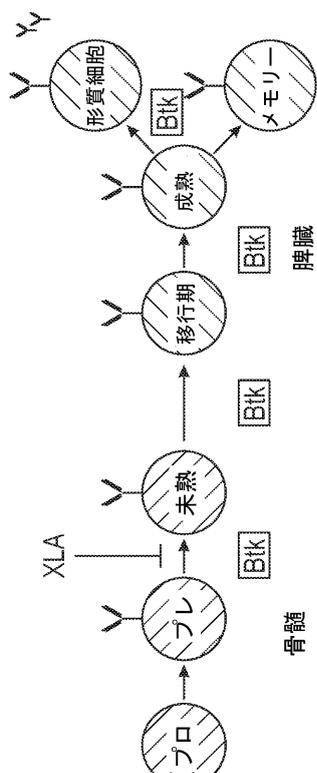
【図 20 - 2】



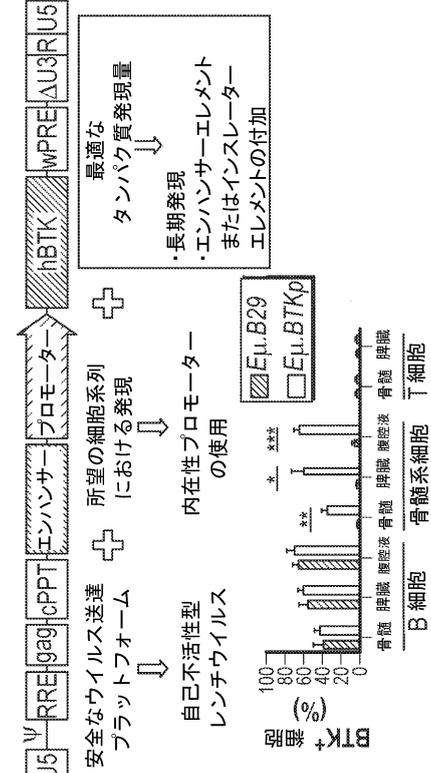
10

20

【図 21】



【図 22】

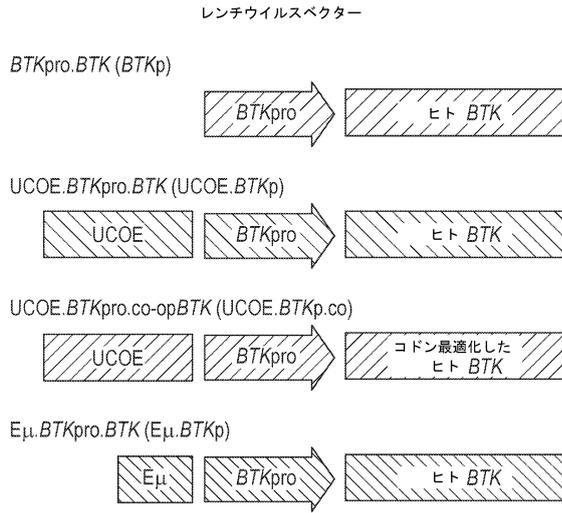


30

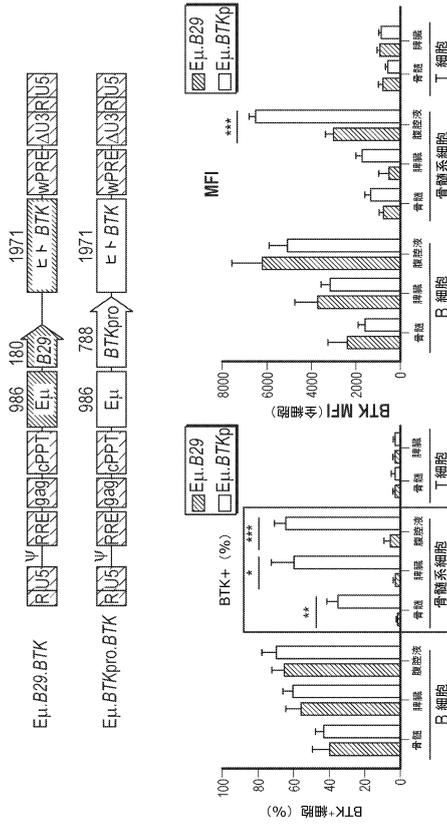
40

50

【 2 3 】



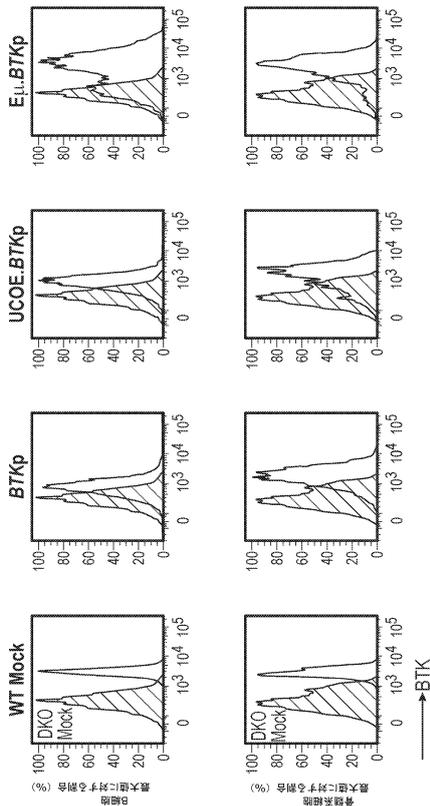
【 2 4 】



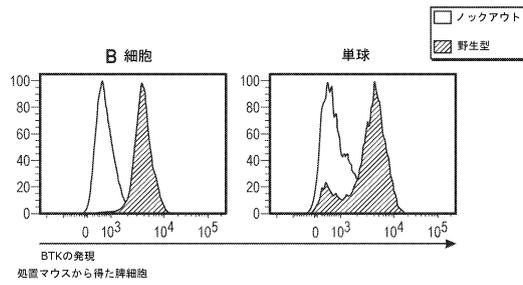
10

20

【 2 5 】



【 2 6 】

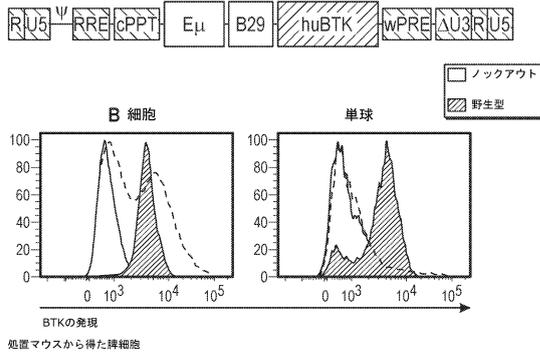


30

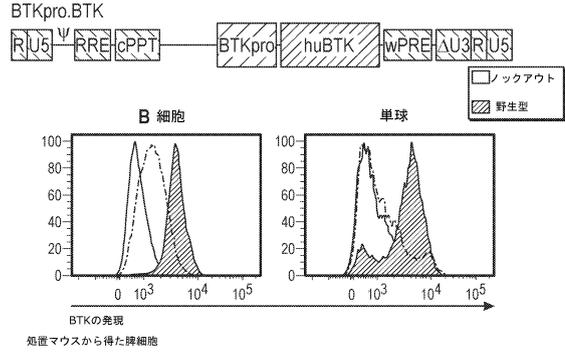
40

50

【図 27】

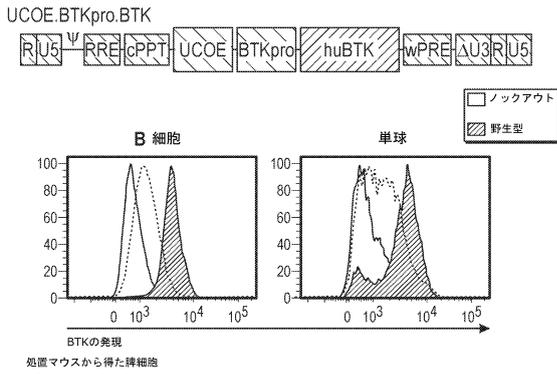


【図 28】

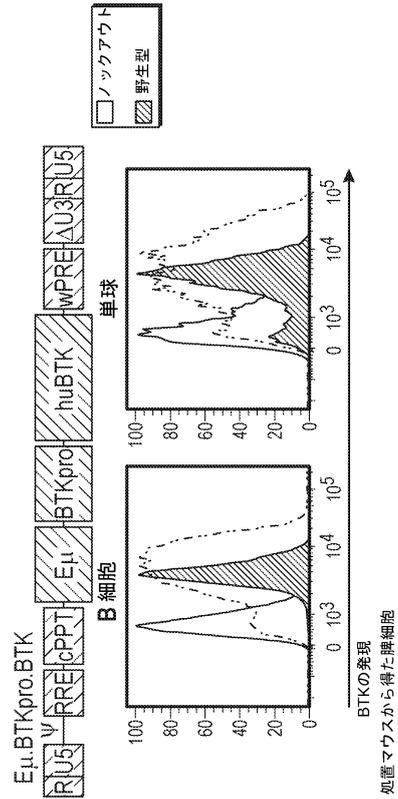


10

【図 29】



【図 30】



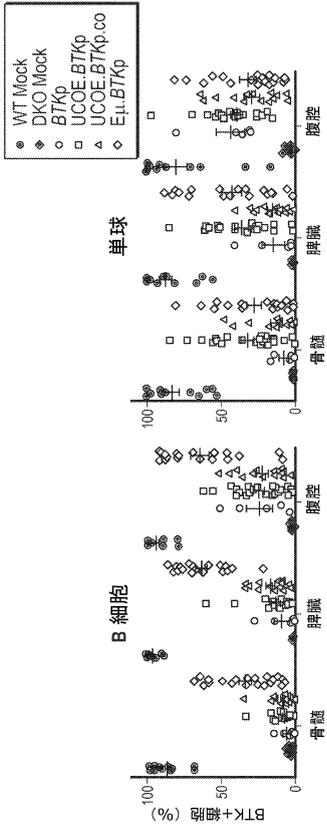
20

30

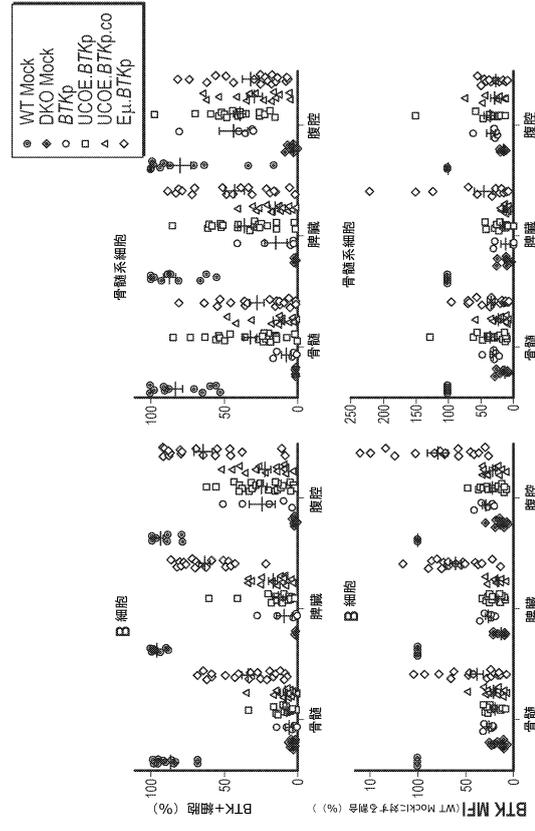
40

50

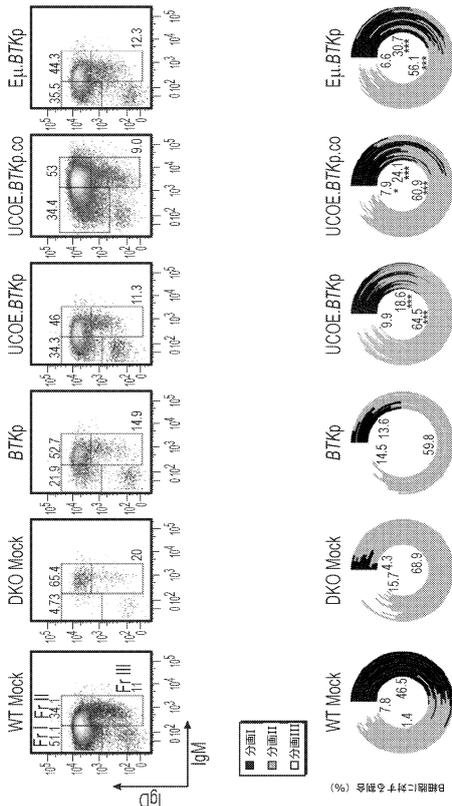
【図 3 1】



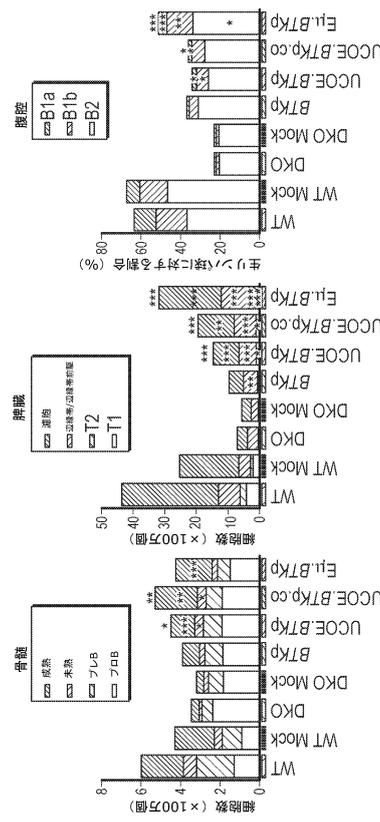
【図 3 2】



【図 3 3】

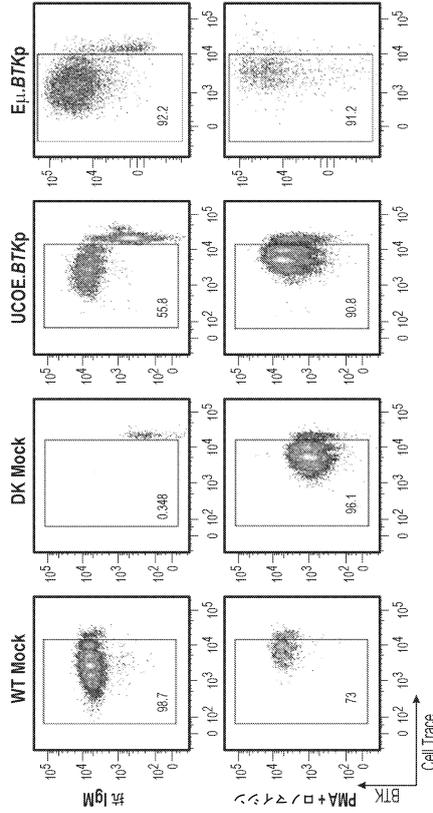


【図 3 4】

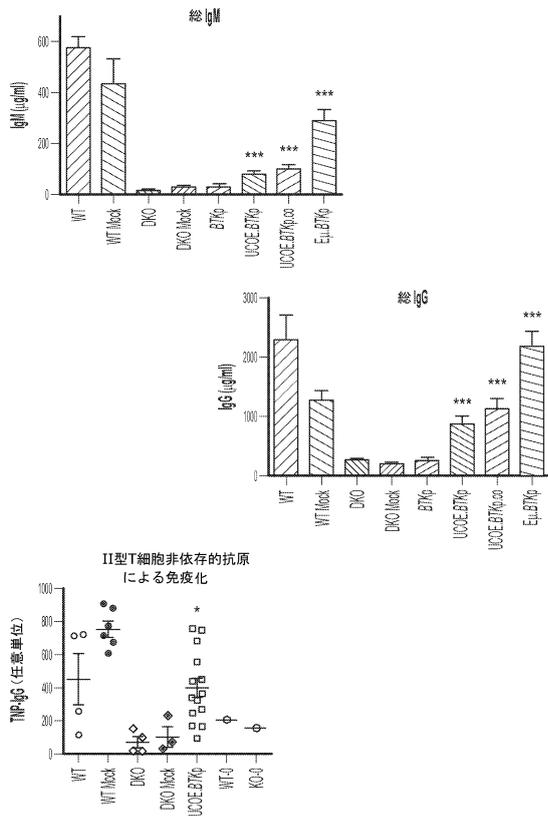


WTコントロールまたはKO mockコントロールはN=約20~30とし、各レンチウイルス構築物につき30~40匹のレシピアエントを使用した。10個未満の独立した実験コホート

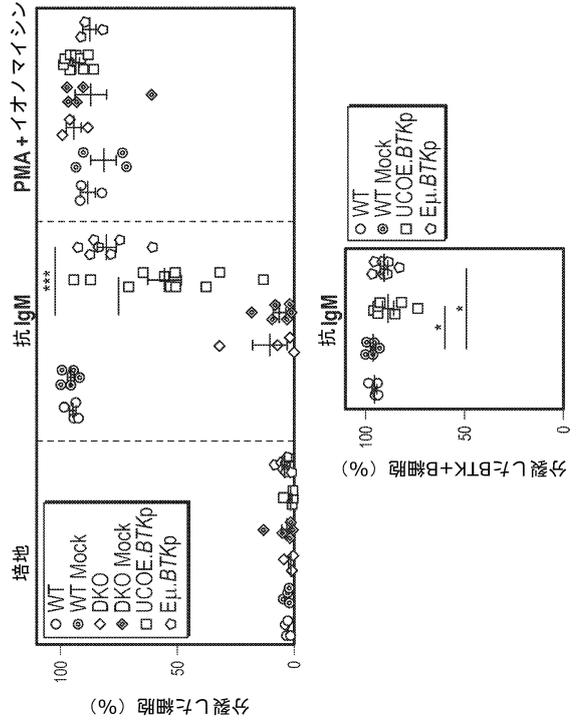
【 図 3 5 】



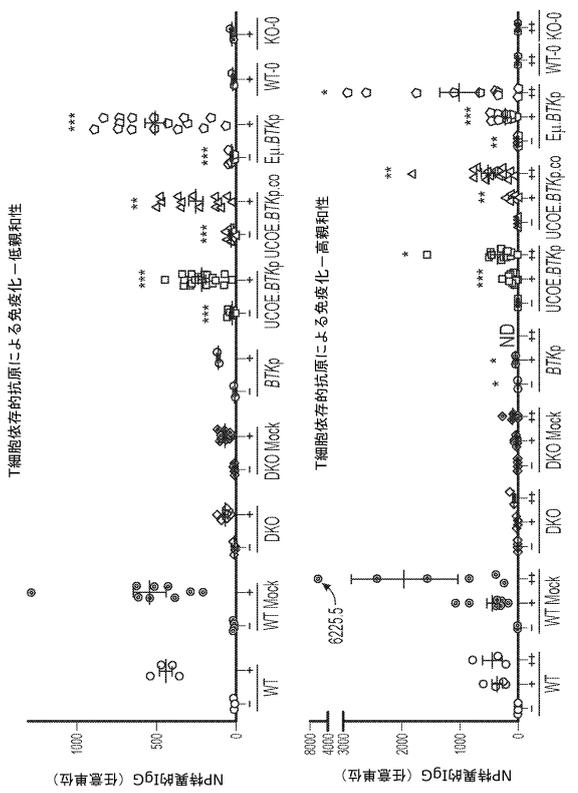
【 図 3 7 】



【 図 3 6 】



【 図 3 8 】



10

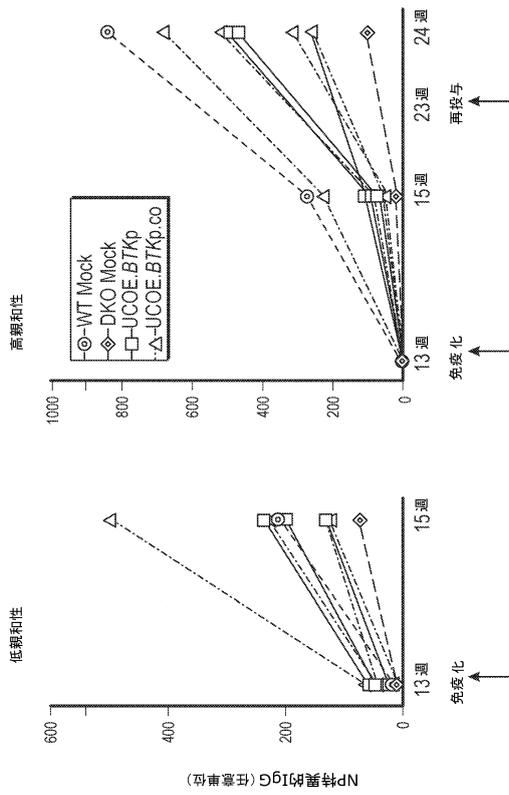
20

30

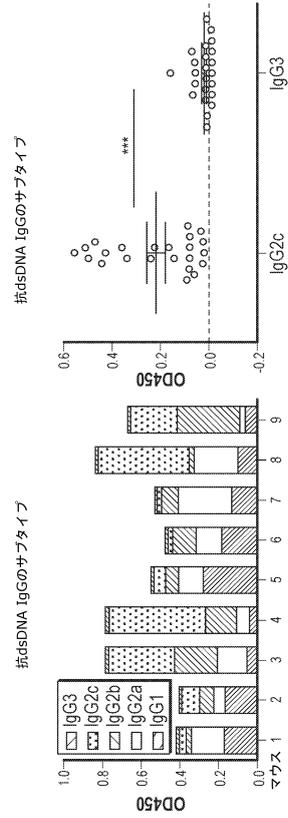
40

50

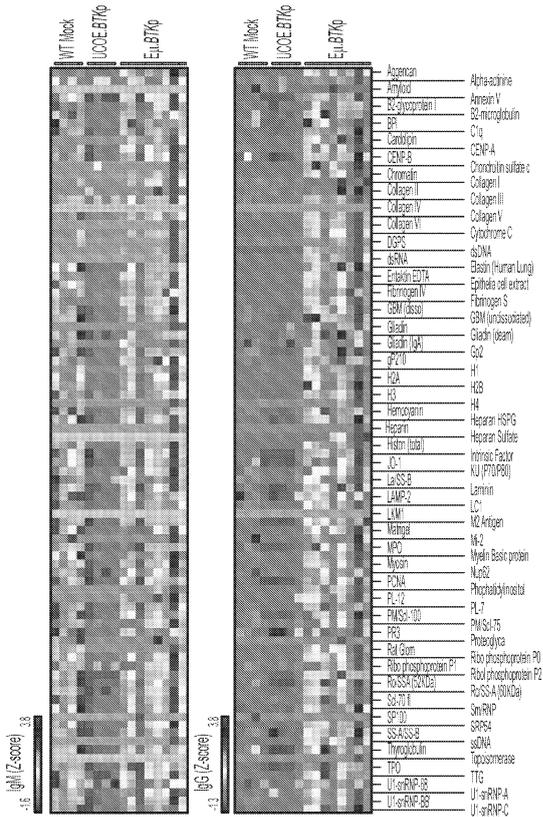
【 図 3 9 】



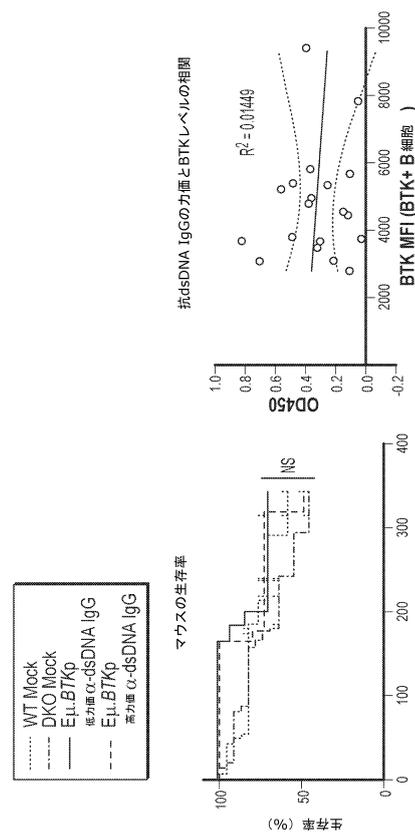
【 図 4 0 】



【 図 4 1 】



【 図 4 2 】



10

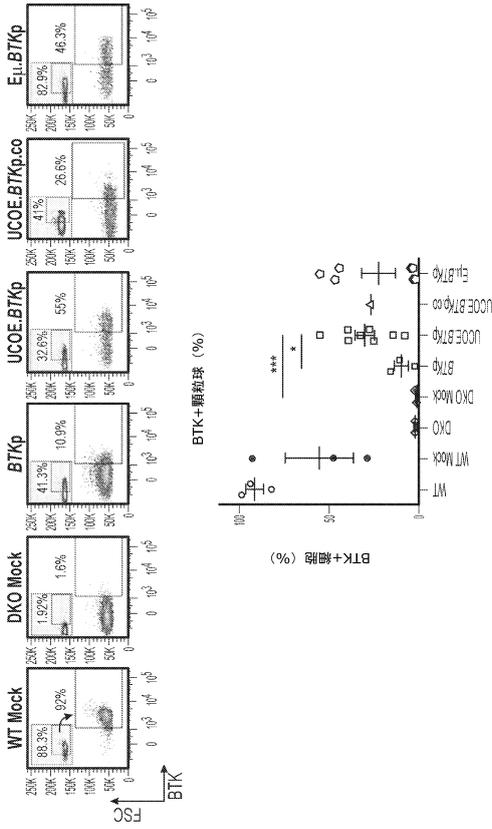
20

30

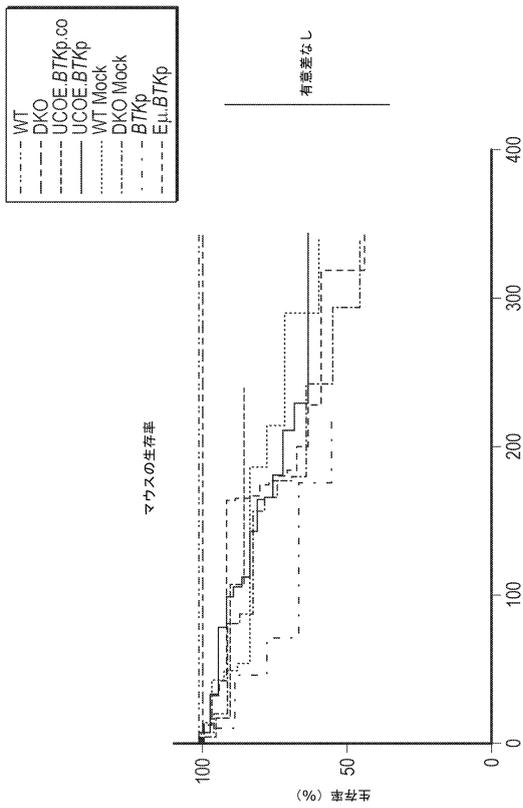
40

50

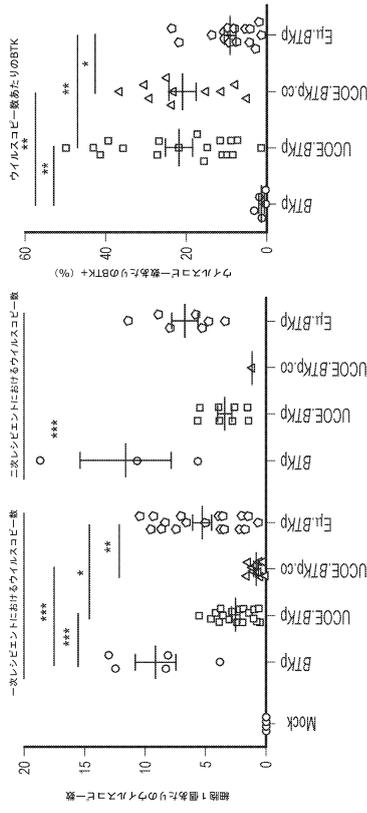
【 図 4 3 】



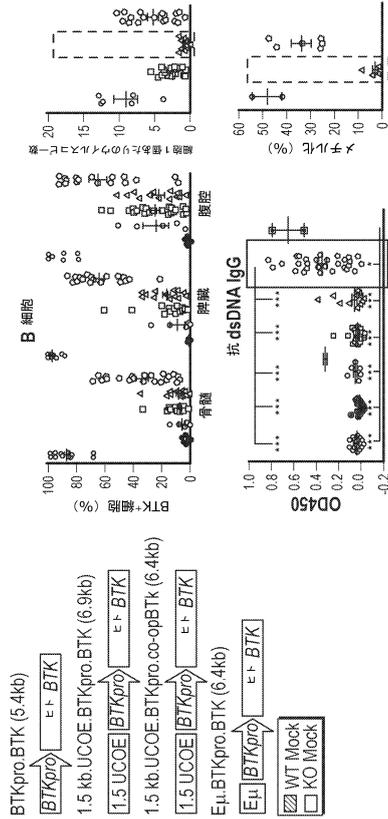
【 図 4 5 】



【 図 4 4 】



【 図 4 6 】



- ・ベクターのサイズが大きい。
- ・力価が低い
- ・BTKの発現を増加させたい。

1.5kbのUCOEを使用したところ、BTKproのレンチウイルスよりも向上が現れた。しかしながら、このレンチウイルス構築物はさらに改良が必要である。

10

20

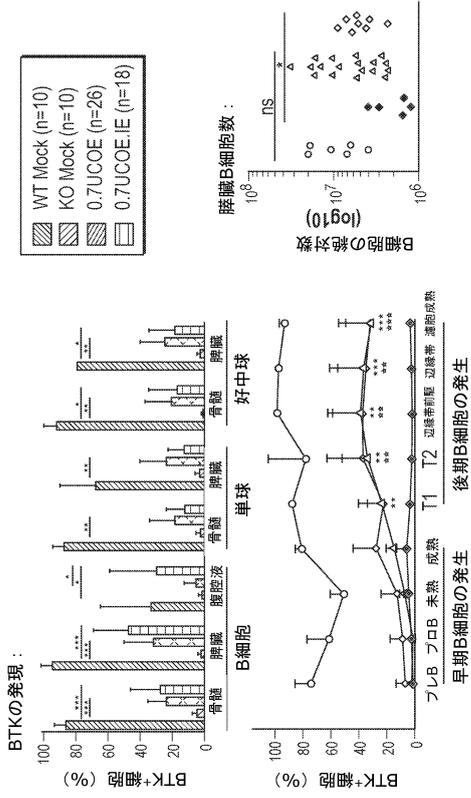
30

40

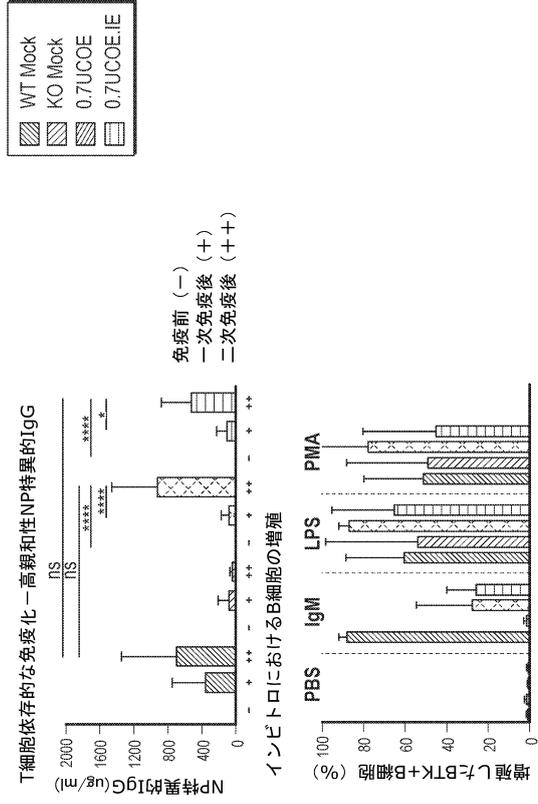
50

【図 4 7】

0.7UCOE:BTKpおよび0.7UCOE:IE:BTKpは BTKの発現と脾臓B細胞数を回復する

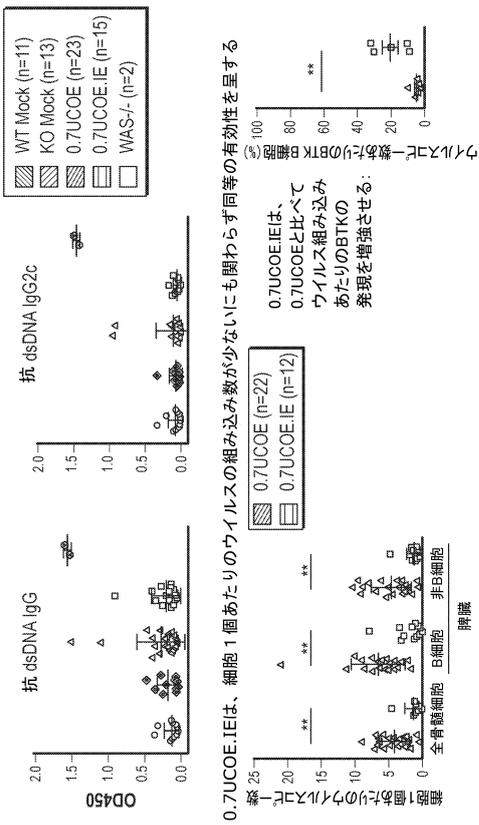


【図 4 8】

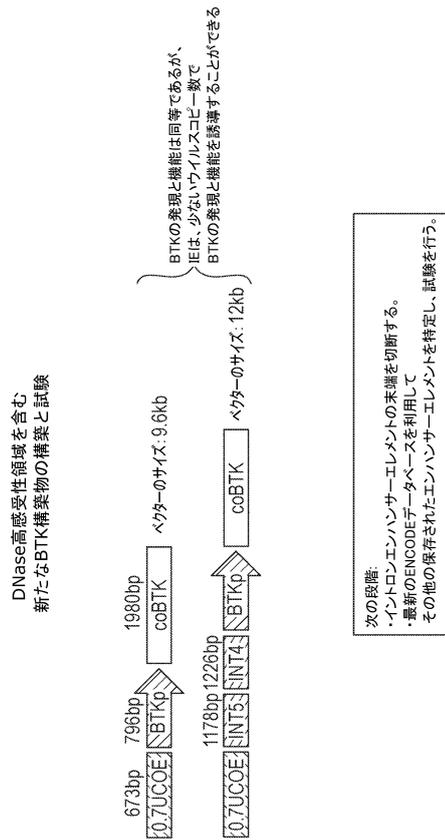


【図 4 9】

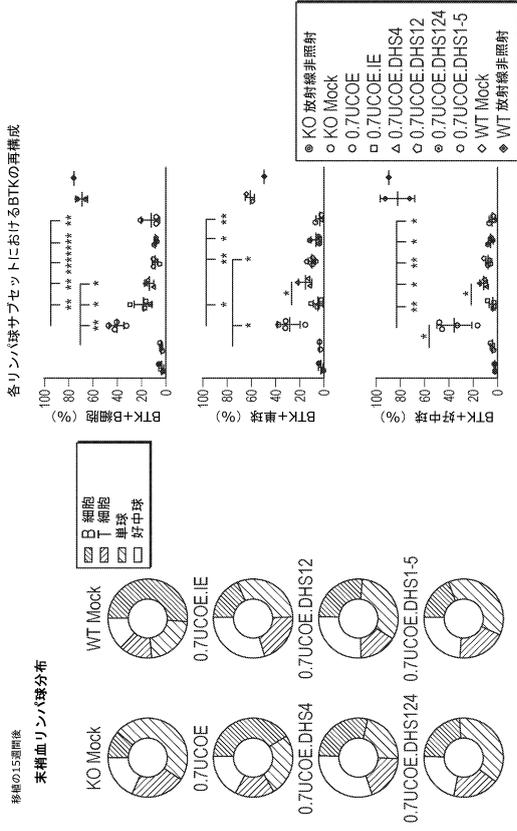
0.7UCOEおよび0.7UCOE:IEが産生する自己抗体の力価は、自己免疫コントロール (および過去に報告されているBTKプロモーター非含有ベクター) によるものよりも低い:



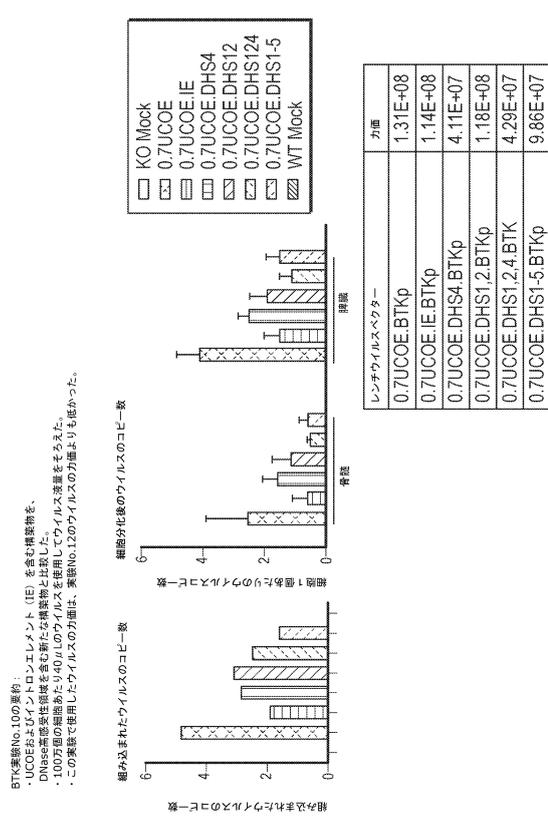
【図 5 0】



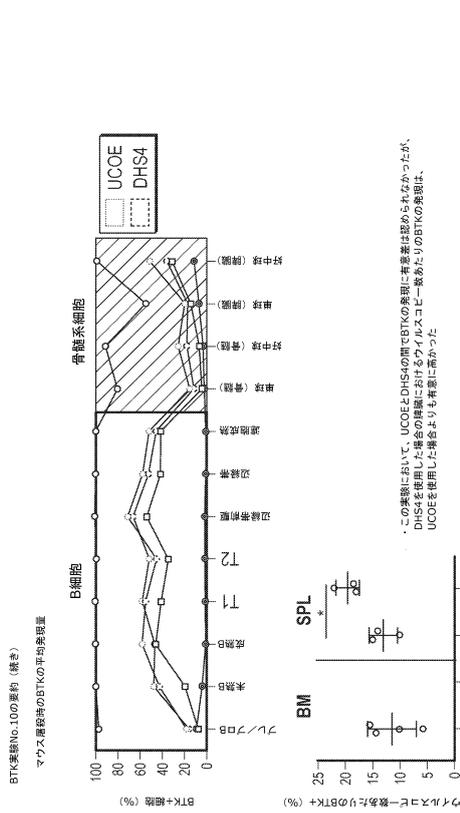
【図 5 4】



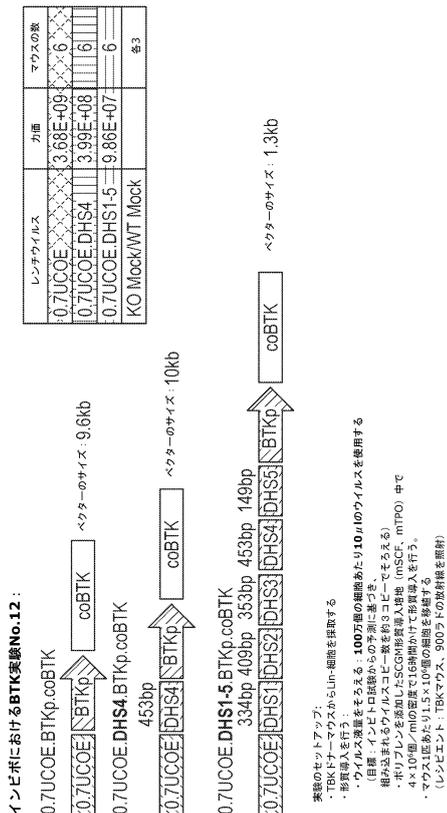
【図 5 5】



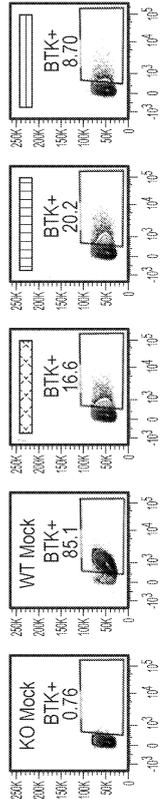
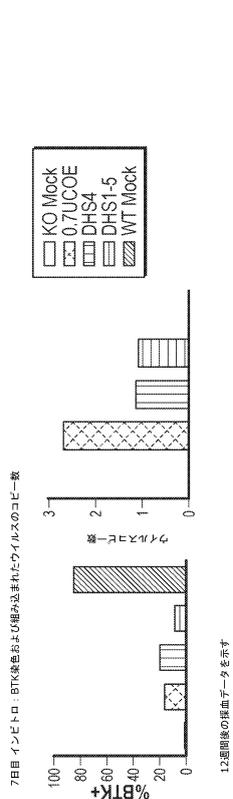
【図 5 6】



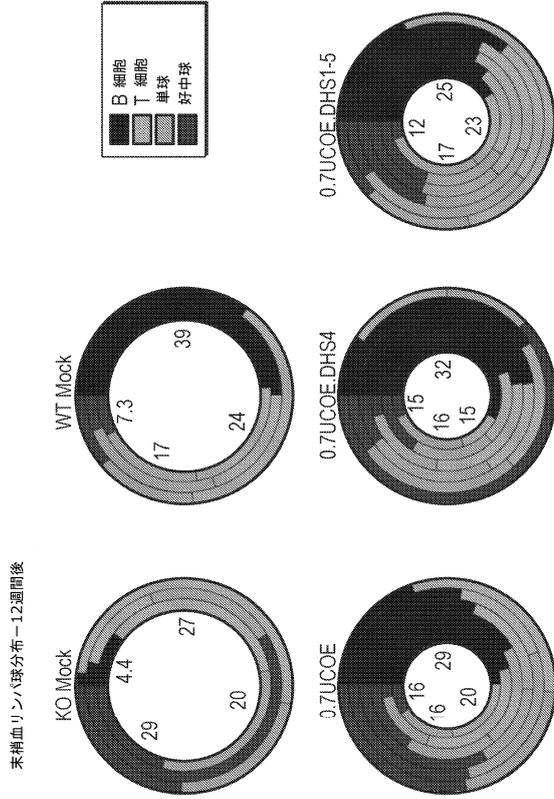
【図 5 7 - 1】



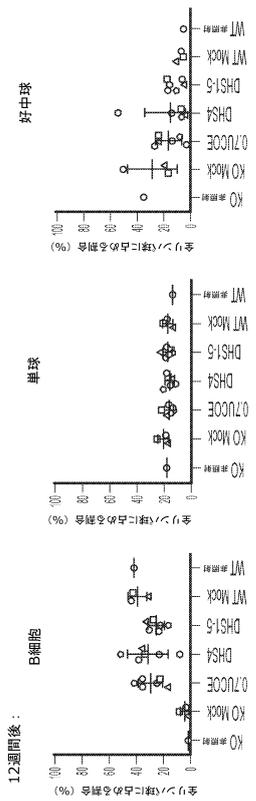
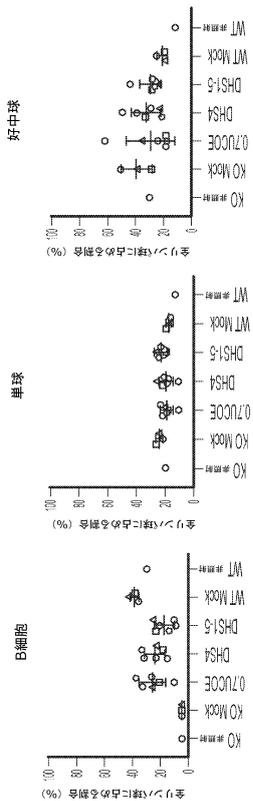
【図 5 7 - 2】



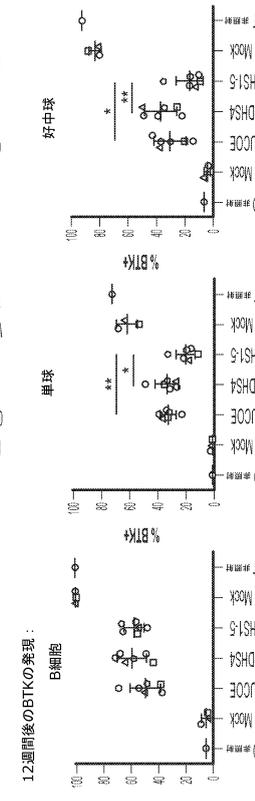
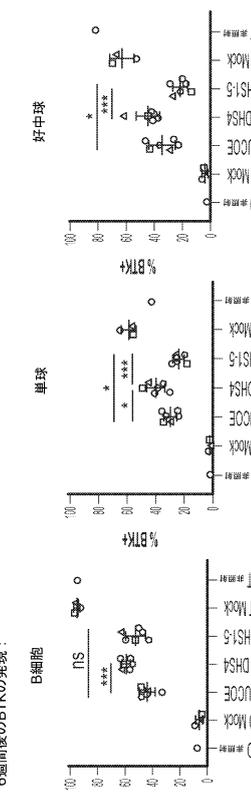
【図 5 8】



【図 5 9】



【図 6 0】



10

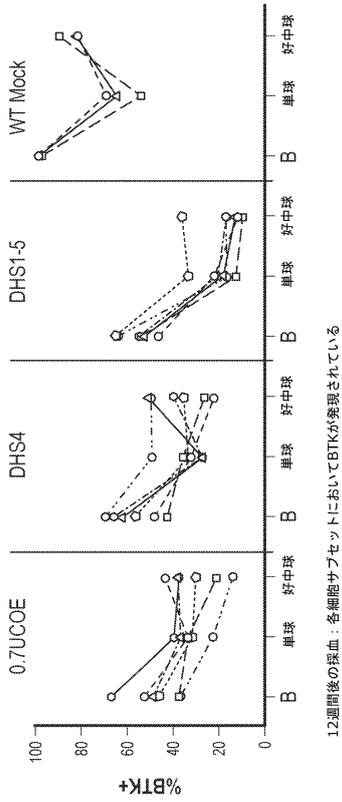
20

30

40

50

【図 6 1】



【図 6 2】

当初の**coBTK**と新たな**coBTK**のインビトロにおける比較
 目的: コドン最適化した2種のBTKを使用した場合のBTKの発現およびBTKの染色を比較する

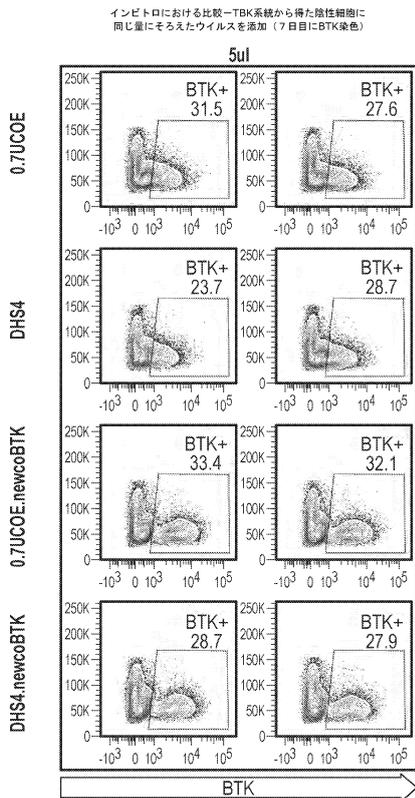
セットアップ:
 TBKマウスからのLin⁻細胞の単離
 形質導入培地: 完全SCGM+mSCF+mTPO+ポリブレン
 1 × 10⁶個 (4 × 10⁶個/ml) の細胞に5 μl, 10 μlまたは20 μlのウイルスを添加
 インビトロで7日間培養後、7日目にBTK染色およびウイルスコピー数を分析

レンチウイルス構築物:
 0.7UCOE.BTKp.**coBTK** (力価: 1.17 × 10⁹)
 0.7UCOE.DHS4.BTKp.**coBTK** (力価: 1.09 × 10⁹)
 0.7UCOE.BTKp.**newcoBTK** (力価: 1.81 × 10⁹)
 0.7UCOE.DHS4.BTKp.**newcoBTK** (力価: 1.13 × 10⁹)

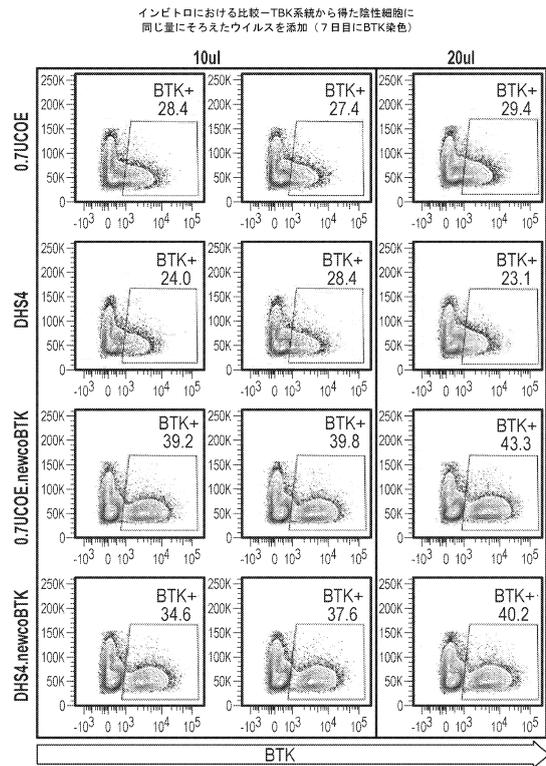
10

20

【図 6 3 - 1】



【図 6 3 - 2】



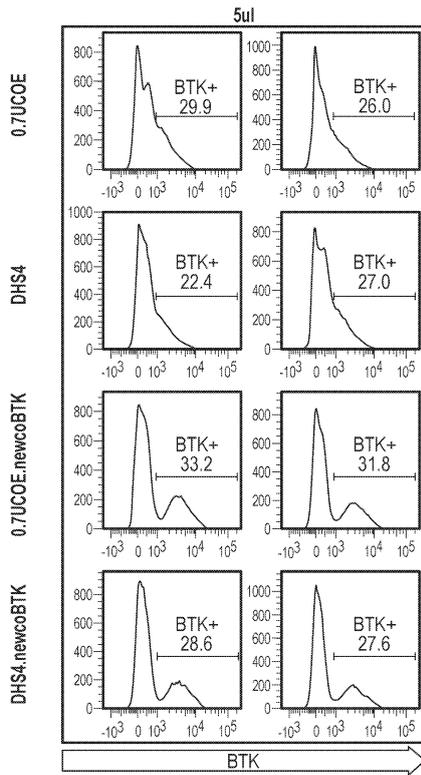
30

40

50

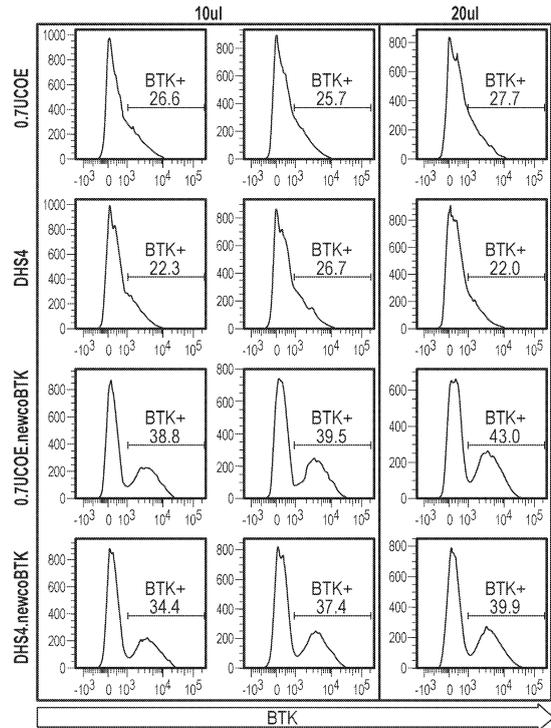
【 図 6 3 - 3 】

インビトロにおける比較-TBK系統から得た陰性細胞に
同じ量にそろえたウイルスを添加 (7日目に染色)



【 図 6 3 - 4 】

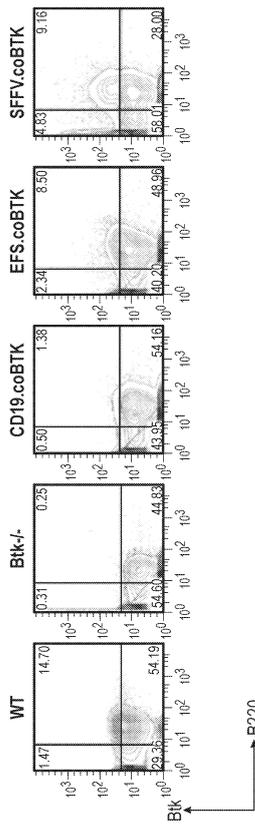
インビトロにおける比較-TBK系統から得た陰性細胞に
同じ量にそろえたウイルスを添加 (7日目に染色)



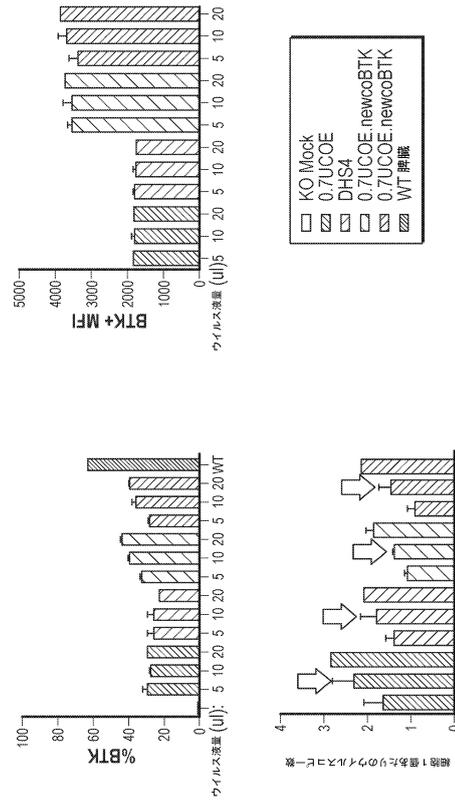
10

20

【 図 6 3 - 5 】



【 図 6 4 】



30

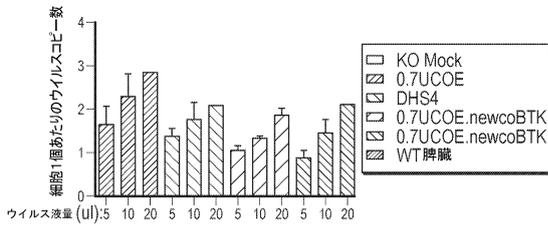
40

50

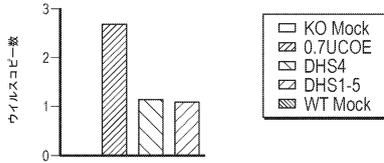
【 図 6 5 】

実験群：
 0.7UCOE.BTKp.coBTK (力価: 1.17×10^9) — マウス5匹
 0.7UCOE.DHS4.BTKp.coBTK (力価: 1.09×10^9) — マウス5匹
 0.7UCOE.BTKp.newcoBTK (力価: 1.81×10^9) — マウス5匹
 0.7UCOE.DHS4.BTKp.newcoBTK (力価: 1.13×10^9) — マウス5匹
 KO Mock—マウス3匹
 WT Mock—マウス3匹
 放射線非照射コントロール—各1匹
 さらにマウスを追加するか、あるいは実験群からマウスを差し引くか？

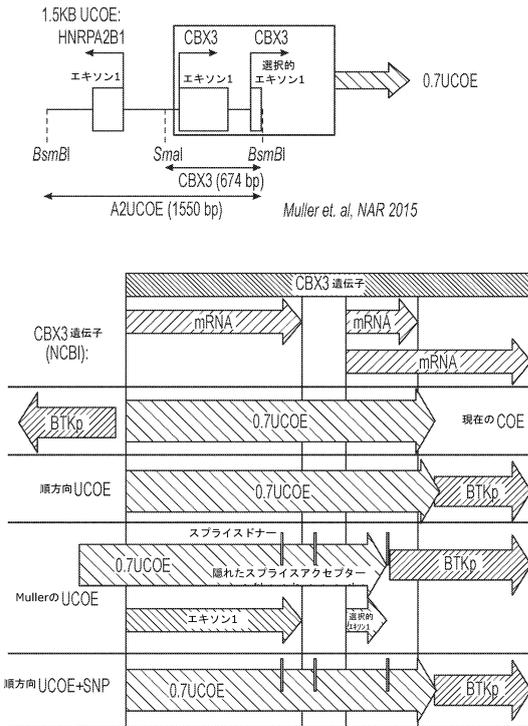
形質導入のセットアップ：
 ウイルス液量をそろえる—100万個の細胞あたり10 μ l
 (現在実施中のインビボ試験において一貫性をもたせるため)



組み込まれたウイルスのコピー数
 インビボBTK実験No.12
 (ウイルスコピー数はそろえるものとして予測)



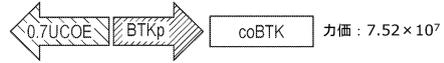
【 図 6 7 】



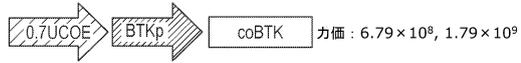
【 図 6 6 】

0.7UCOE.BTKp.coBTKは、遺伝子療法用ベクターの候補として非常に有力なままであるが、最近になって力価が低下してきている (10⁹から10⁷に低下した)。

現在、本発明者らのUCOEエレメントは、以下のように「逆方向」であり、アンチセンス転写物によって力価が低下している可能性がある。



以下のようにUCOEを順方向で挿入することによって力価が増加した。

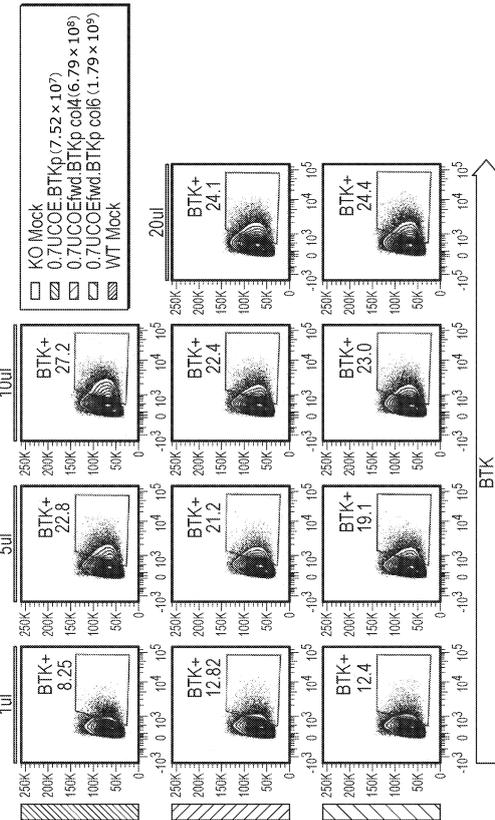


10

20

【 図 6 8 - 1 】

ウイルス液量をそろえたインビボ試験における
 0.7UCOE.BTKpと0.7UCOE.fwd.BTKpの比較

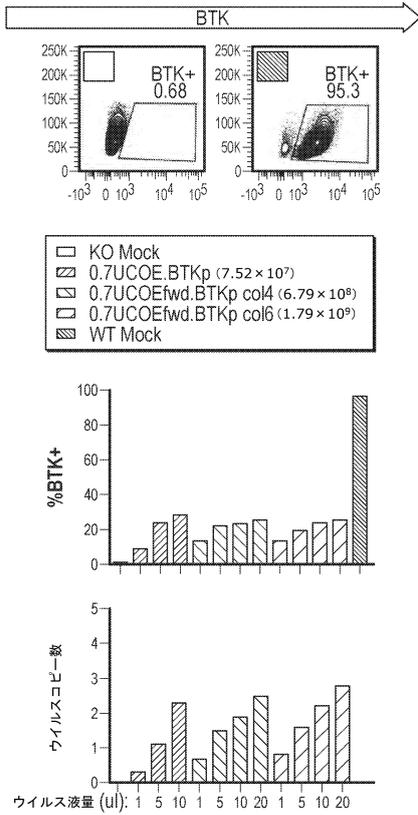


30

40

50

【 図 6 8 - 2 】



【 図 6 9 】

- 臨床用BTKレンチウイルス構築物の完成までの計画
- ・プロモーター:
 - ・BTKプロモーターはプロモーターとして最適である。
 - ・UCOEエレメント:
 - ・0.7kbのUCOEは、BTK発現のサイレンシングを効果的に防ぎ、ベクターの力価を増加することができる。
 - ・UCOEを順方向に配置すると力価が有意に増加するが、BTKの発現量に変化は見られない。
 - ・これは、我々の現在の(逆方向の)UCOEが、高力価の構築物と同等に機能することを示唆している。
 - ・現在、逆方向と順方向を比較して、最終的なベクターを選択しようとしている。
 - ・エンハンサーエレメント:
 - ・0.7UCOE.IE.Btkpは、0.7UCOE.Btkpよりも少ないウイルス組み込み数でBTKの発現を回復させる。
 - ・短いエンハンサーエレメント(DHS領域)を付加しても、これよりも長いイントロンエンハンサー(IE)構築物と比べて力価は増加しなかった。
 - ・しかしながら、UCOE(順方向)はIEの力価を増加させ、その増加量は1logを上回ることから、順方向のUCOEはすべての構築物において力価を増加させることが示唆される。
 - ・0.7UCOE.DHS4.Btkpは、0.7UCOE.IE.Btkpよりも強力に、B細胞および骨髄系細胞におけるBTKの発現を増加させることから、0.7UCOE.DHS4.Btkpベクターが最も適している可能性が示唆される。
 - ・コドン最適化したBTK:
 - ・上述の「複合構築物」は、当初のco-Btk構築物よりもBTKの発現を有意に増加させることから、最適なベクターにおいて使用するものとする。

10

20

【 図 7 0 】

- インビボBTK実験No.12:
- ・2月27日にNP-CGGで免疫し、7日目の3月6日に採血した。
 - ・総IgG、総IgMおよびNP特異的IgG/IgMをELISAで測定した。
 - ・3月(3/27)に2回目の免疫化を実施予定。
 - ・免疫状態の確立に応じて、4月の初旬~中旬頃に屠殺する。
- インビボBTK実験No.13:
- ・(0.7UCOEと0.7UCOEfwd)の比較、それぞれマウス6匹
 - ・3月8日に12週目の採血とNP-CGGによる免疫化を行った。
- 新たな(複合)コドン最適化BTK:
- ・0.7UCOE構築物、0.7UCOEfwd構築物および0.7UCOE.DHS4構築物にクローニングした。
 - ・インビボ実験を実施中である。

【 図 7 1 】

XLA 患者由来幹細胞のアフェレーシスは施設内審査委員会 (IRB) による承認を受けている

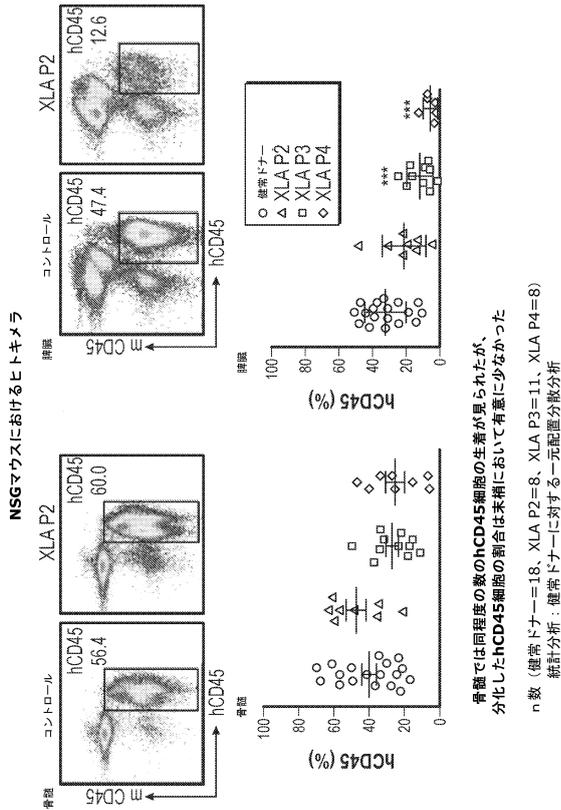
患者ID	性別	位置	タイプ	cDNA	タンパク質	試料	BTKの発現	アフェレーシスの実施	コメント
XLA P1	M	-	-	-	-	CD34	+	NIH	
XLA P2	M	イントロン12	スプライシングバリエーションだと見られる	エキソン13の欠損	ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構により、タンパク質量は少ないと見られる	CD34, PBMC	-	Seattle Children's	
XLA P3	M	コード配列	ミスセンス	C. 1766A >G	p>E589G	CD34, PBMC	+	Seattle Children's	XLA P3とXLA P4は親類である
XLA P4	M	コード配列	ミスセンス	C. 1766A >G	p>E589G	CD34, PBMC	+	Seattle Children's	

30

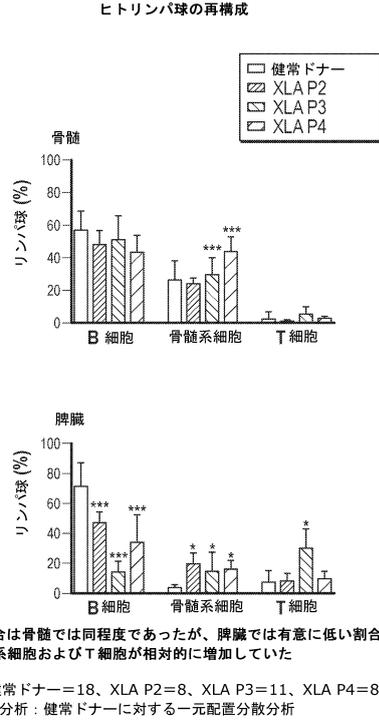
40

50

【 図 7 2 】



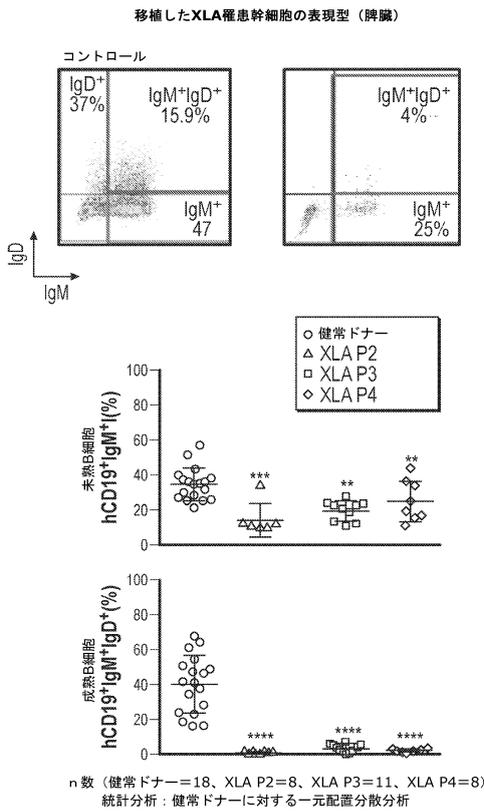
【 図 7 3 】



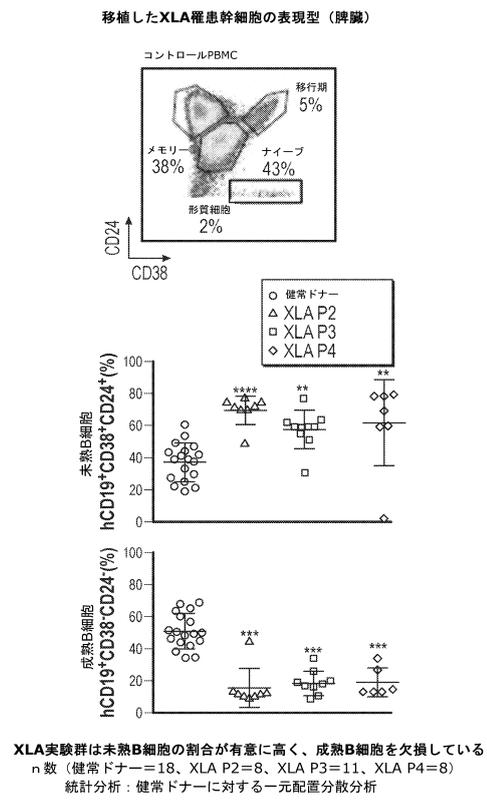
10

20

【 図 7 4 】



【 図 7 5 】

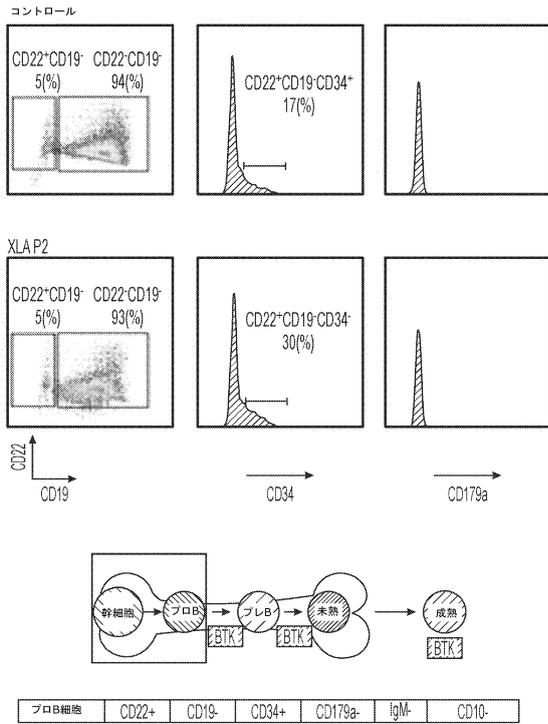


30

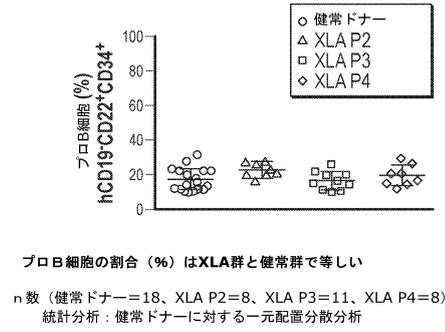
40

50

【 図 7 6 - 1 】



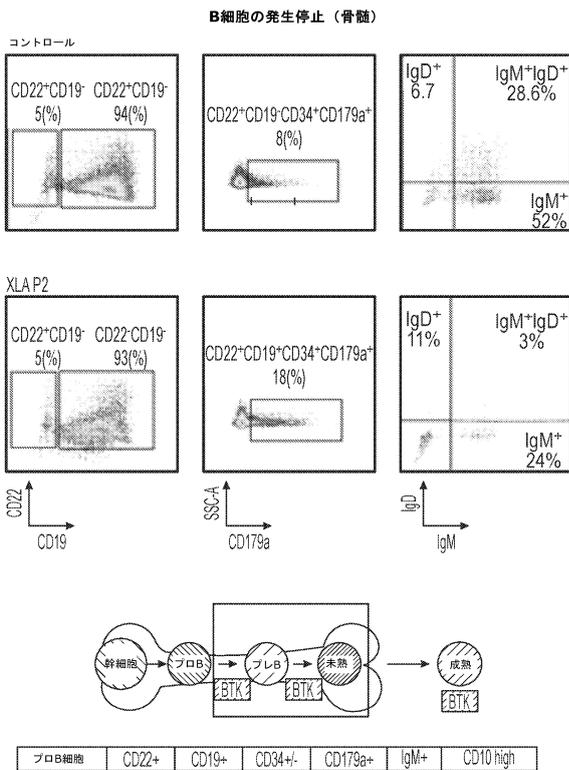
【 図 7 6 - 2 】



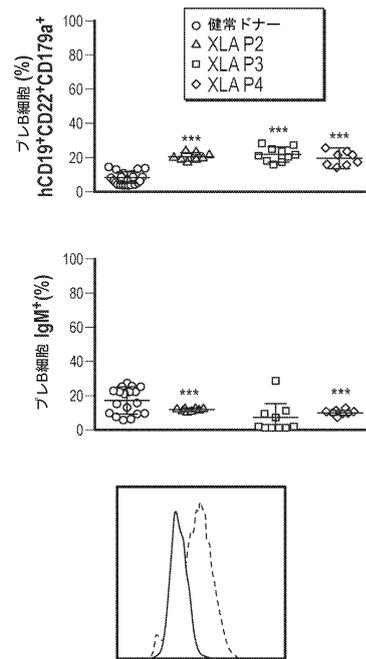
10

20

【 図 7 7 - 1 】



【 図 7 7 - 2 】



30

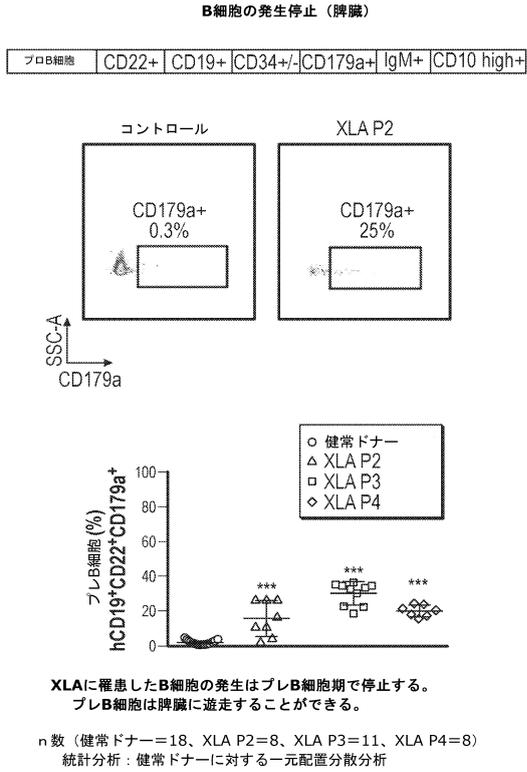
40

XLA患者は、健常コントロールよりもプロB細胞の割合 (%) が有意に高い

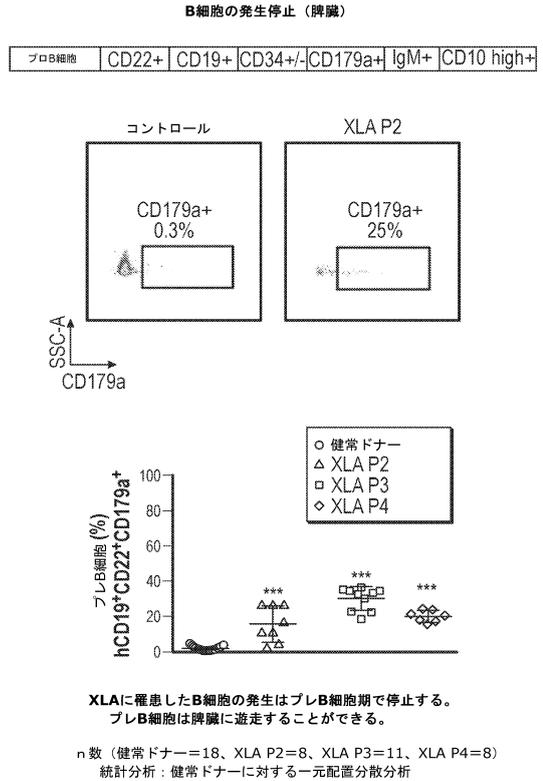
n 数 (健常ドナー=18, XLA P2=8, XLA P3=11, XLA P4=8)
統計分析: 健常ドナーに対する一元配置分散分析

50

【 図 7 8 】



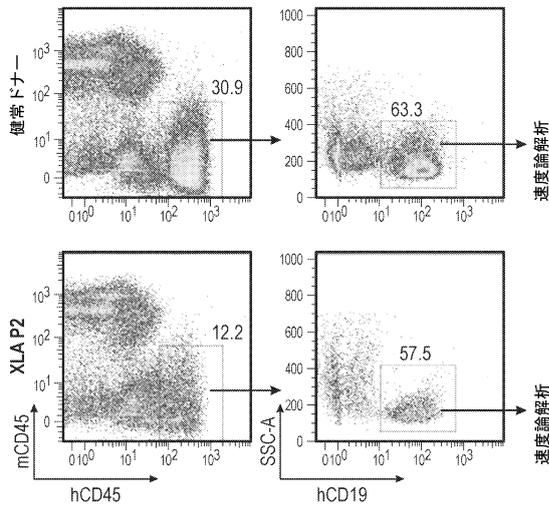
【 図 7 9 】



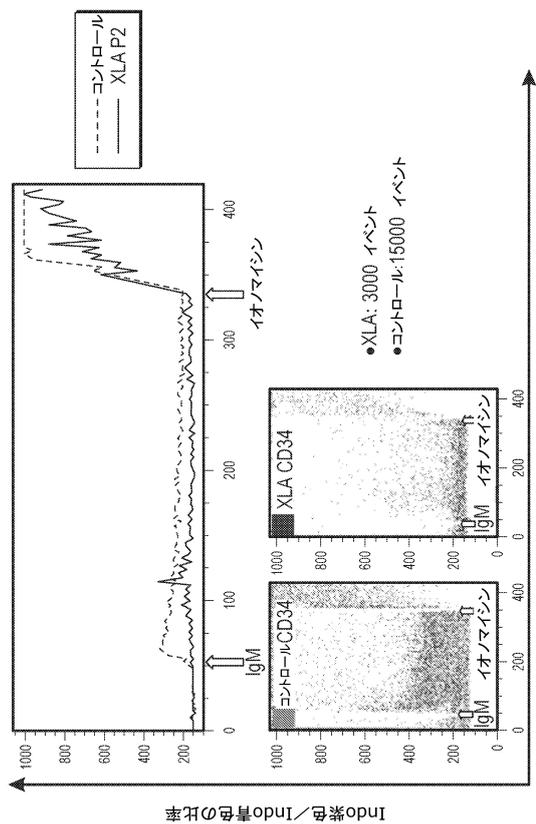
10

20

【 図 8 0 - 1 】



【 図 8 0 - 2 】

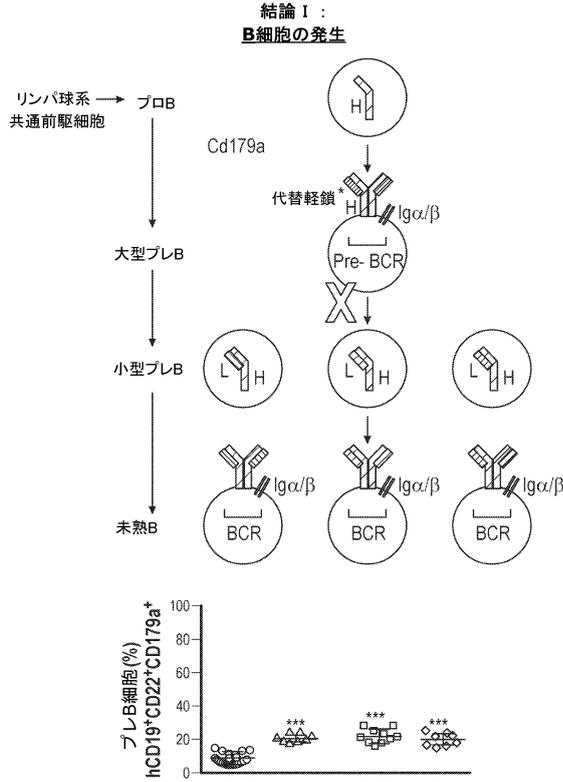


30

40

50

【 図 8 1 】



【 図 8 2 】

結論 I :

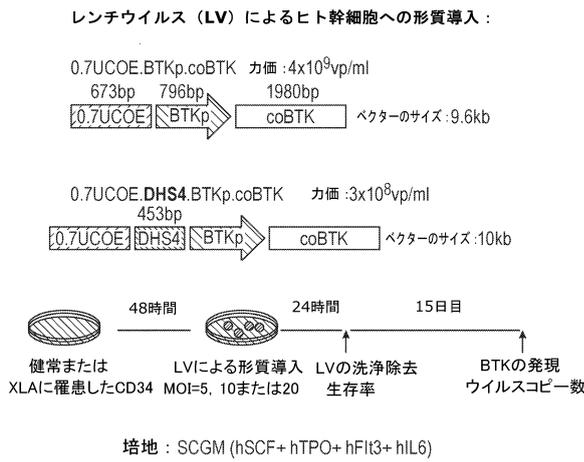
NSGマウスにおいてXLA患者のB細胞表現型を再現することができるか？

- ・脾臓におけるB細胞の数と割合は少なくなっている。
- ・骨髄においてB細胞の発生はプレB細胞期で停止する。
- ・プレB細胞は成熟B細胞に分化することができない。
- ・骨髄を出た未熟B細胞は脾臓に遊走する。
- ・XLA患者の脾臓B細胞は機能異常を示す。

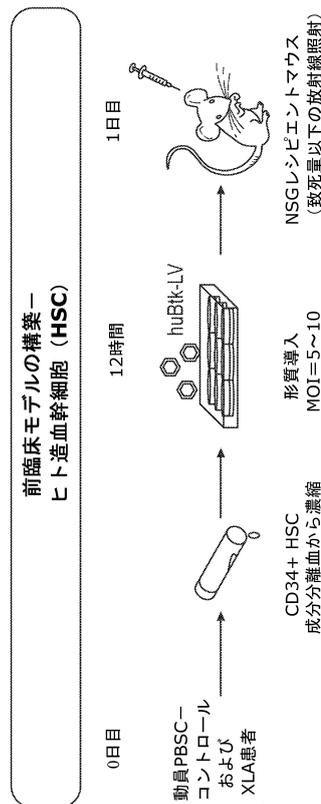
10

20

【 図 8 3 】



【 図 8 4 】



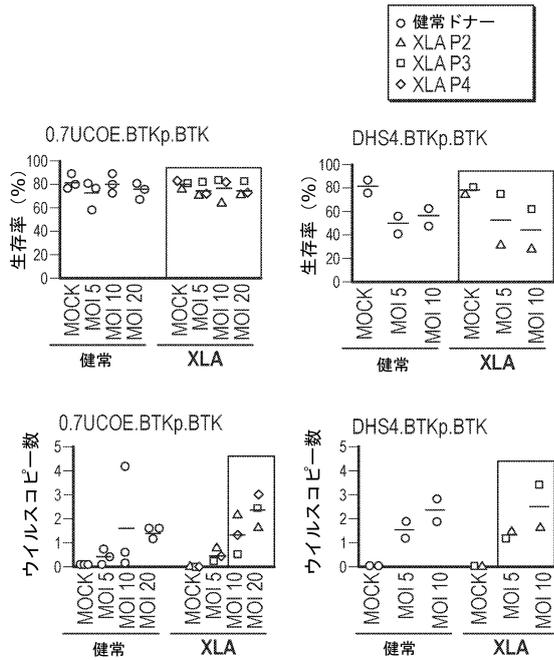
30

40

50

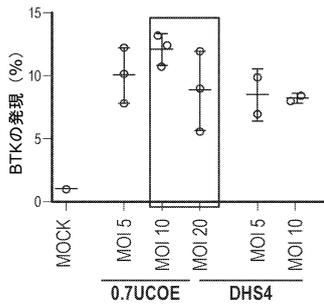
【 図 8 5 】

レンチウイルスによるヒト幹細胞への形質導入：



0.7UCOE.BTKp.BTKでは、DHS4と比べて生存率が70%となった。MOI=10およびMOI=20において1~2コピー数で導入され、このウイルスコピー数は臨床的に意義がある。

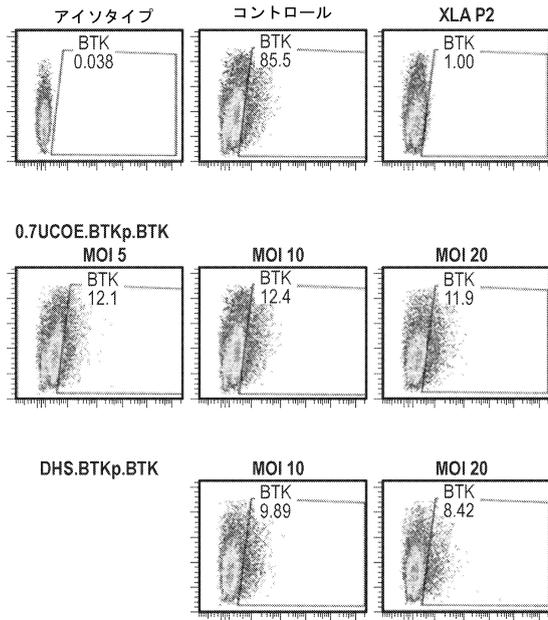
【 図 8 6 - 2 】



非選択環境下において、0.7UCOE.BTKpBTKは、DHS4と比べてBTKの発現量が高くなる

【 図 8 6 - 1 】

XLA P2患者由来の細胞における15日目のBTKの発現



10

20

【 図 8 7 】

結論II：

XLAに罹患した幹細胞にレンチウイルスで形質導入することによってインビボにおいてB細胞の発生を回復させることができるか？

- ・ 0.7UCOE.BTKp.BTKおよび0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKは、MOI=10において1~2コピー数でXLA罹患幹細胞に導入され、このウイルスコピー数は臨床的に意義がある。

インビボ実験：0.7UCOE.BTKp.BTKと0.7UCOE.DHS4.BTKp.BTKをB細胞の再構成と発生について比較する

30

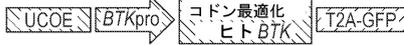
40

50

【 図 8 8 】

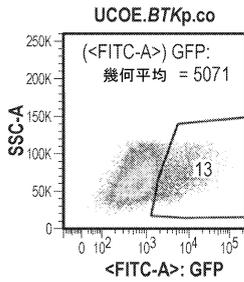
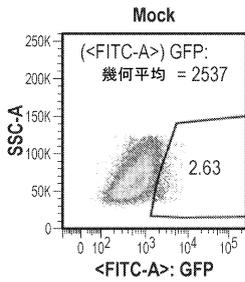
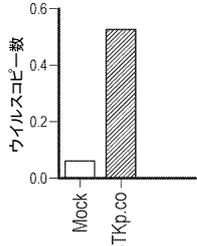
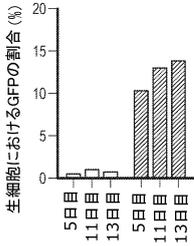
前臨床モデルの構築—
ヒト造血幹細胞 (HSC)

UCOE.BTKpro.co-opBTK (UCOE.BTKp.co) GFP



インビトロにおけるCD34+ HSCへの形質導入:

遺伝子組み込み培養



【 図 8 9 】

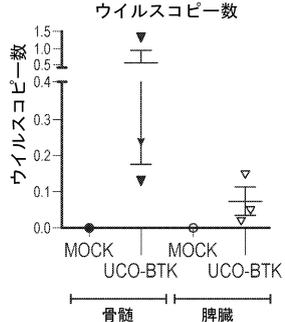
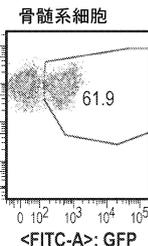
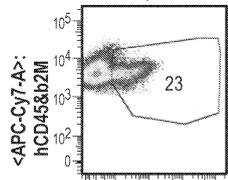
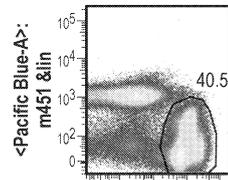
前臨床モデルの構築—
ヒト造血幹細胞 (HSC)

UCOE.BTKpro.co-opBTK (UCOE.BTKp.co) GFP

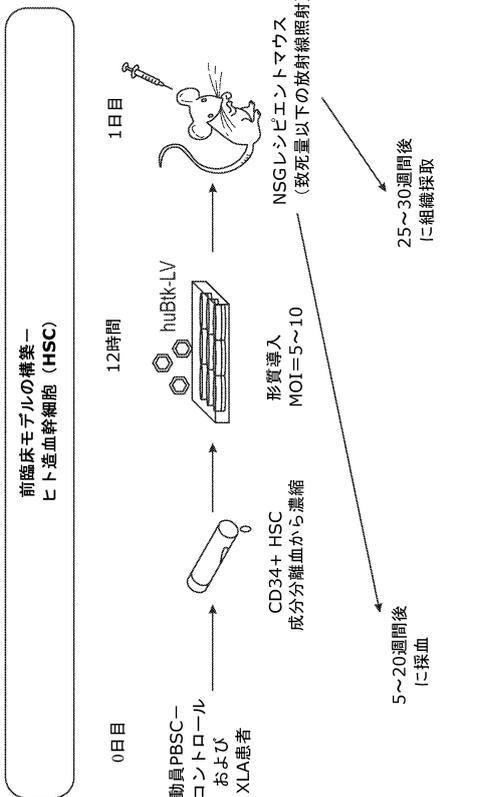


インビボ分析, 6ヶ月以降:

ヒト細胞の
移植

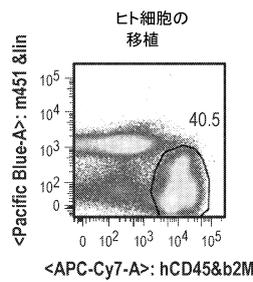
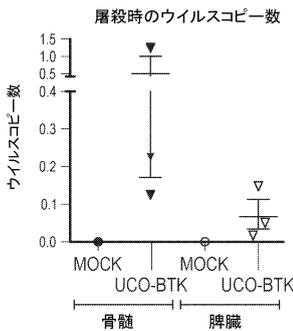
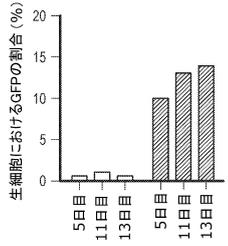


【 図 9 0 】



【 図 9 1 - 1 】

遺伝子組み込み培養



10

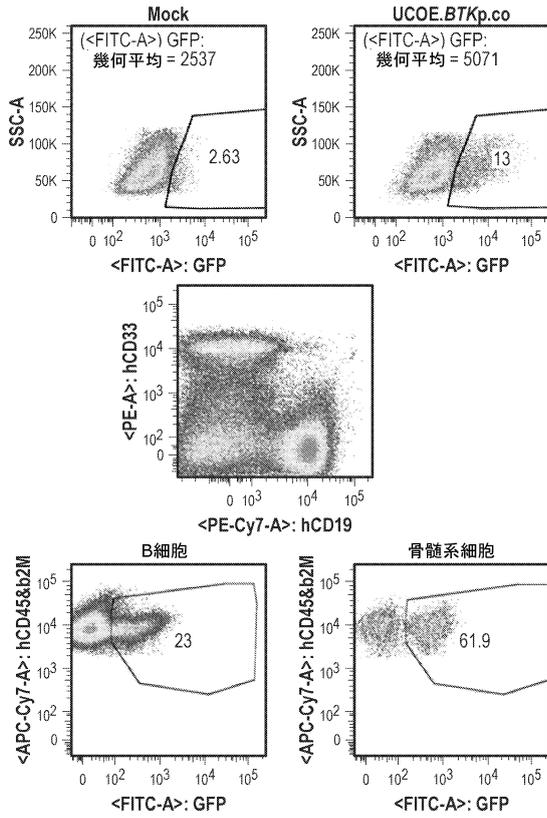
20

30

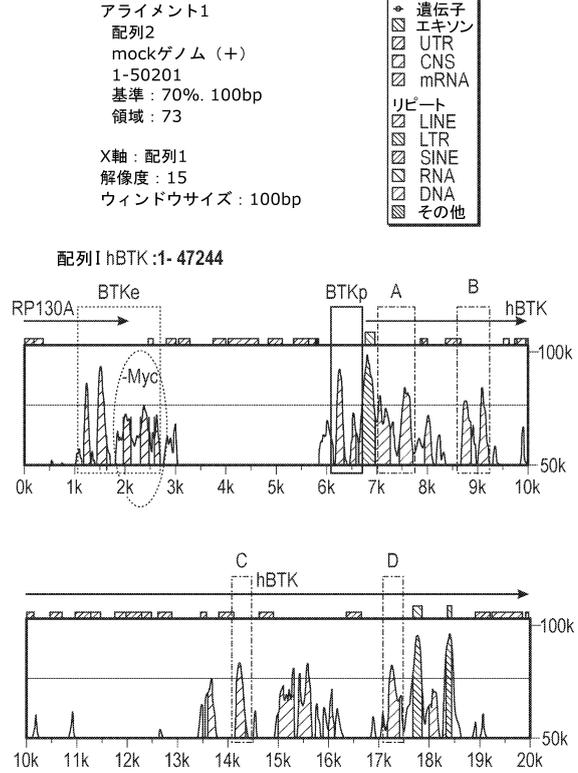
40

50

【 図 9 1 - 2 】



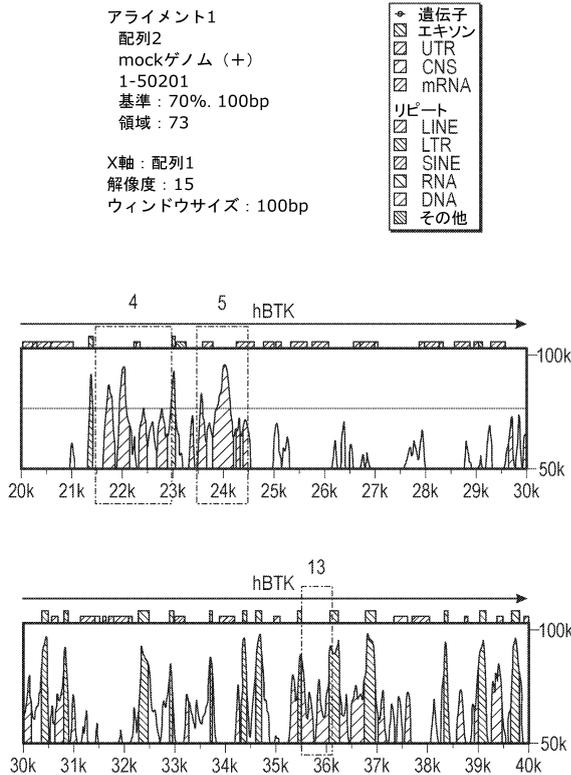
【 図 9 2 - 1 】



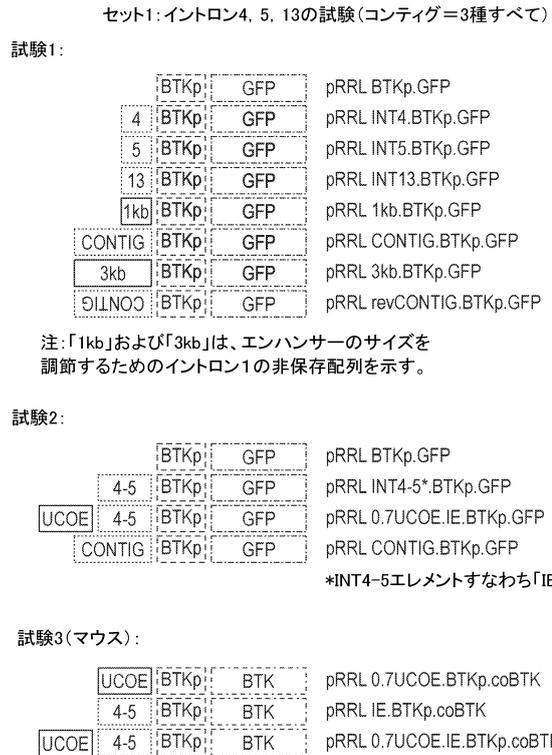
10

20

【 図 9 2 - 2 】



【 図 9 2 - 3 】



30

40

50

【 図 9 2 - 4 】

セット2:イントロン1の試験(4セグメント:A, B, CおよびD)

	BTKp	GFP	pRRL BTKp.GFP
4-5	BTKp	GFP	pRRL IE.BTKp.GFP
INT1:ABCD	BTKp	GFP	pRRL ABCD.BTKp.GFP
DCBA	BTKp	GFP	pRRL DCBA.BTKp.GFP
AB	BTKp	GFP	pRRL AB.BTKp.GFP
A	BTKp	GFP	pRRL A.BTKp.GFP
B	BTKp	GFP	pRRL B.BTKp.GFP

セット3:上流のエンハンサーの試験(BTKe)

UCOE	BTKp	BTK	pRRL 0.7UCOE.BTKp.coBTK
AB	BTKp	BTK	pRRL 0.7UCOE.AB.BTKp.coBTK
AB	BTKp	BTK	pRRL AB.BTKp.coBTK
BTKe	BTKp	BTK	pRRL BTKe.AB.BTKp.coBTK
BTKe	BTKp	BTK	pRRL BTKe.BTKp.coBTK
BTKe	BTKp	BTK	pRRL BTKeΔMyc.BTKp.coBTK

【 図 9 3 】

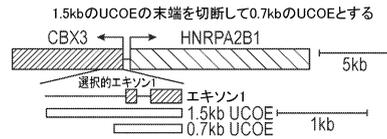


図 93A

DNase高感受性領域(DHS)の同定

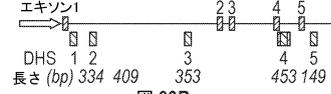


図 93B

BTKのコドン最適化の比較

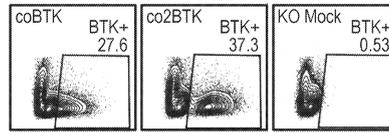


図 93C

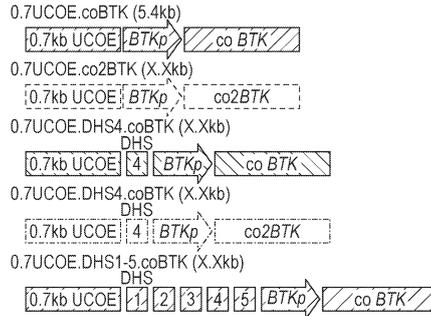
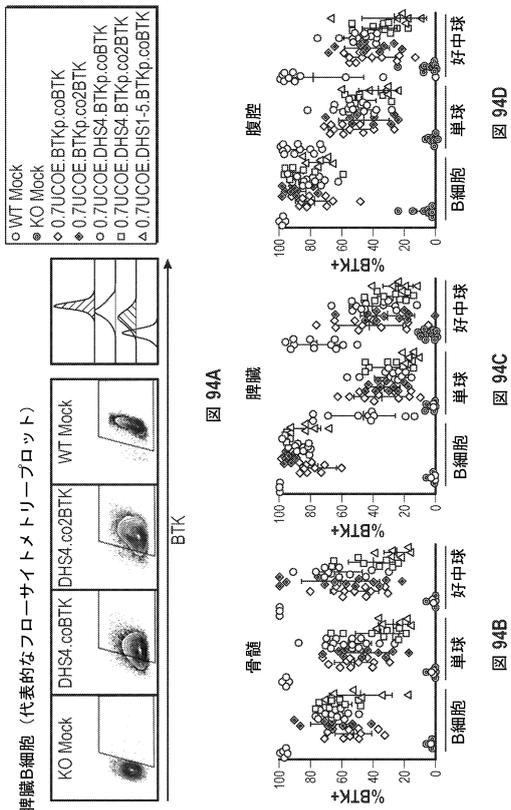


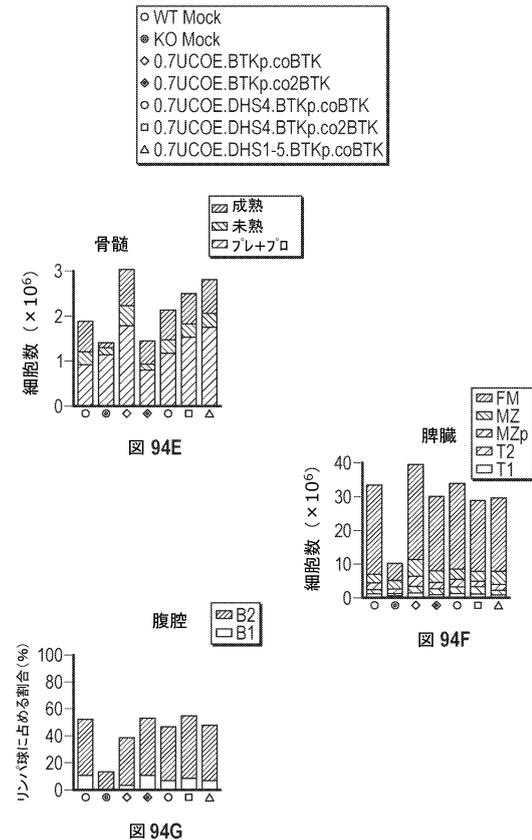
図 93D

【 図 9 4 A - D 】



脾臓B細胞(代表的なフローサイトメトリプロット)

【 図 9 4 E - G 】



10

20

30

40

50

【 図 9 4 H 】

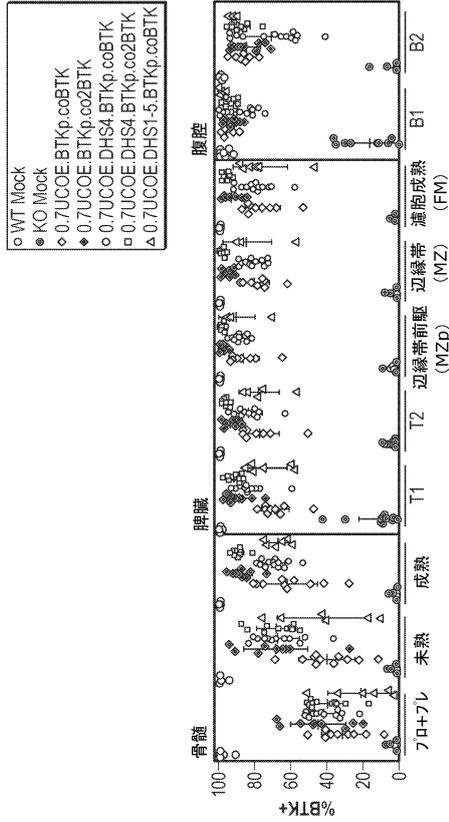


図 94H

【 図 9 4 I 】

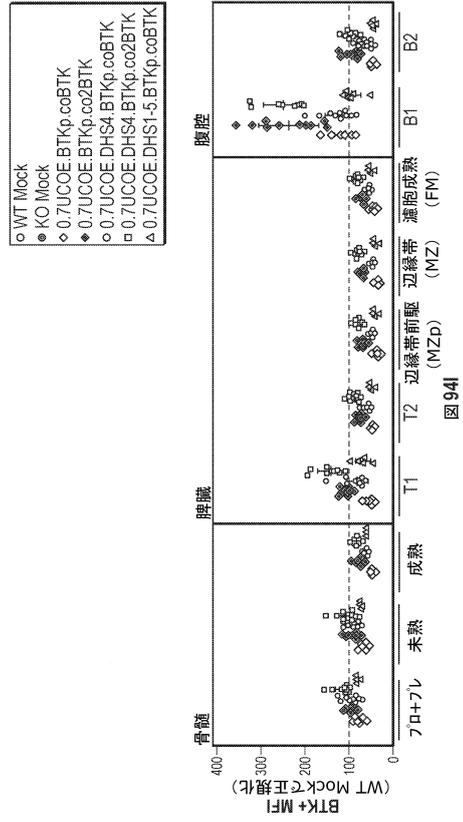


図 94I

10

20

【 図 9 5 A - C 】

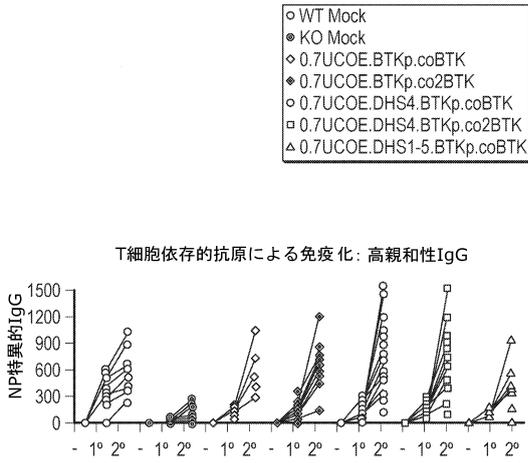


図 95A

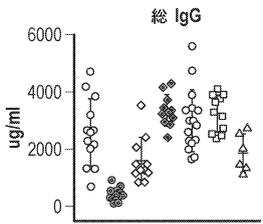


図 95B

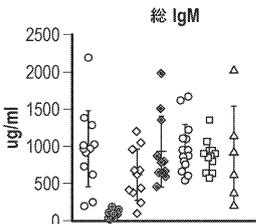


図 95C

【 図 9 5 D - E 】

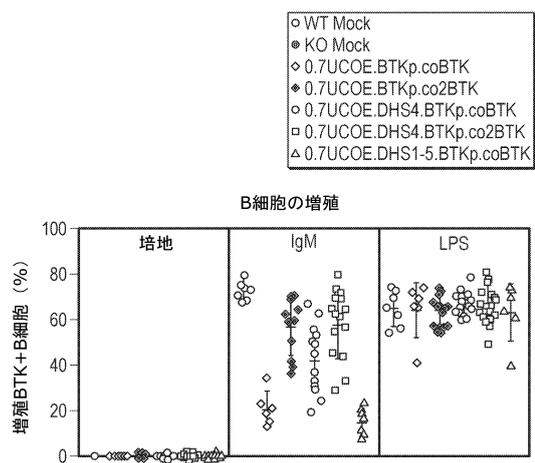


図 95D

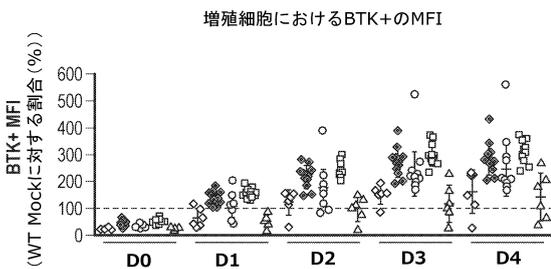


図 95E

30

40

50

【図 95 F】

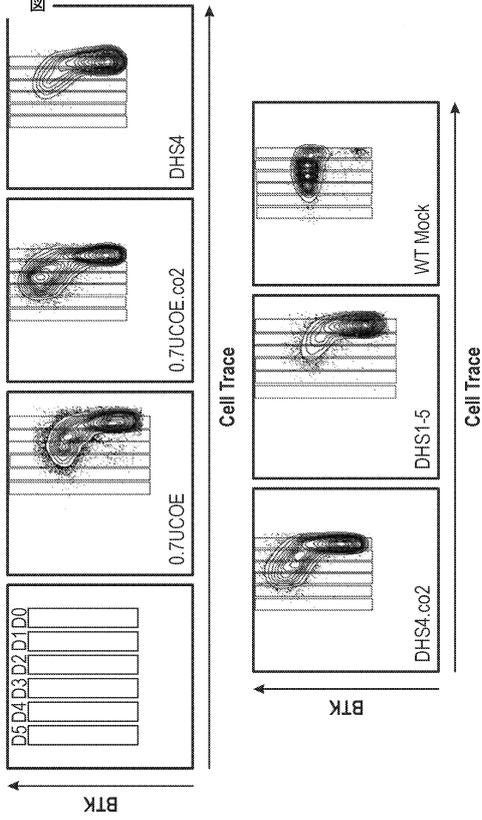


図 95F

【図 96】

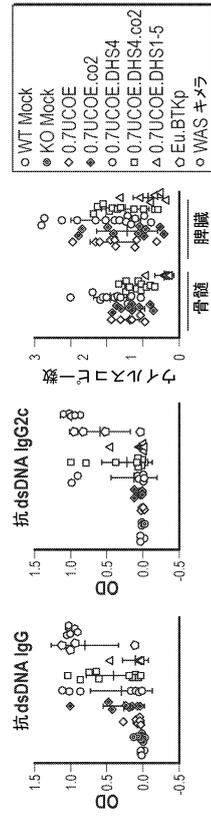


図 96C

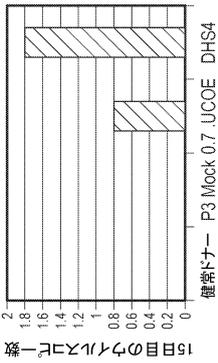
図 96B

図 96A

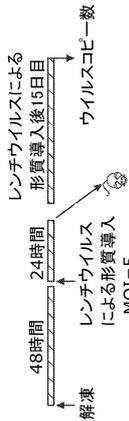
10

20

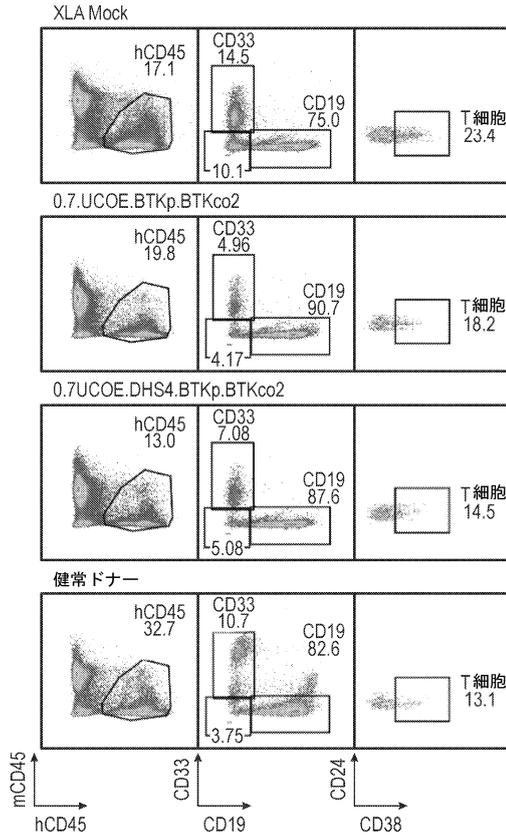
【図 97】



15日目の脾臓細胞



【図 98 A】

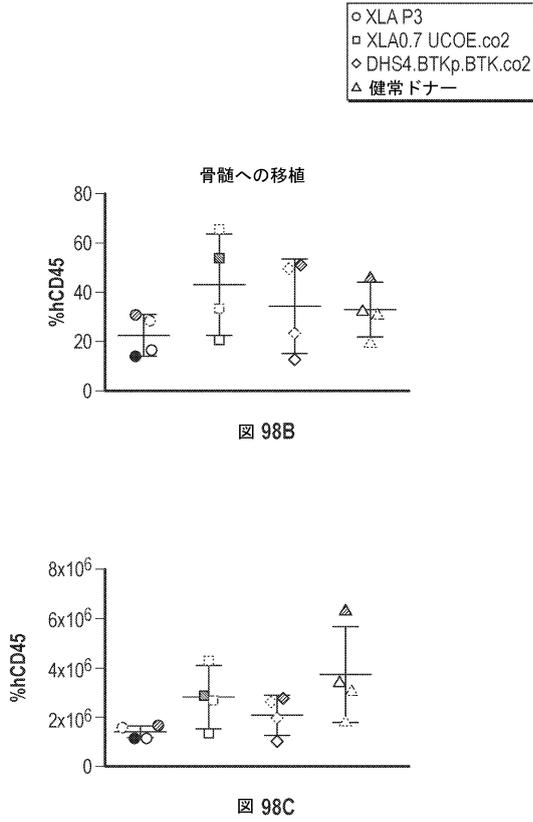


30

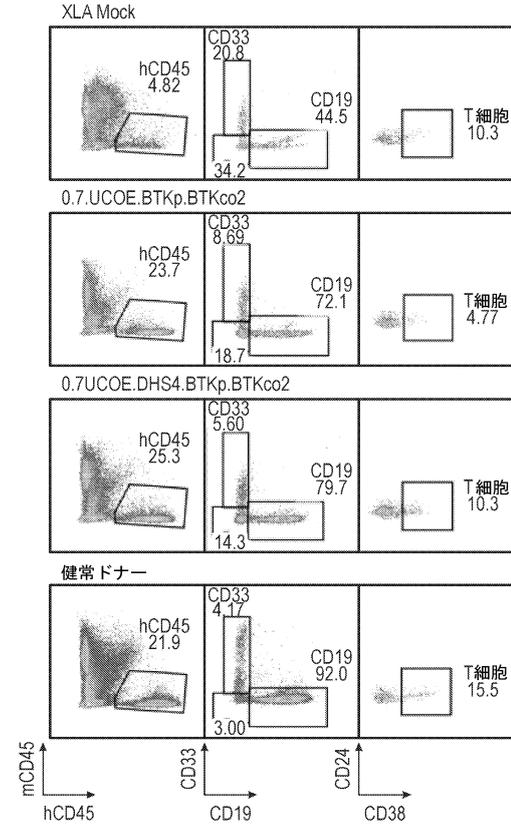
40

50

【 図 9 8 B - C 】



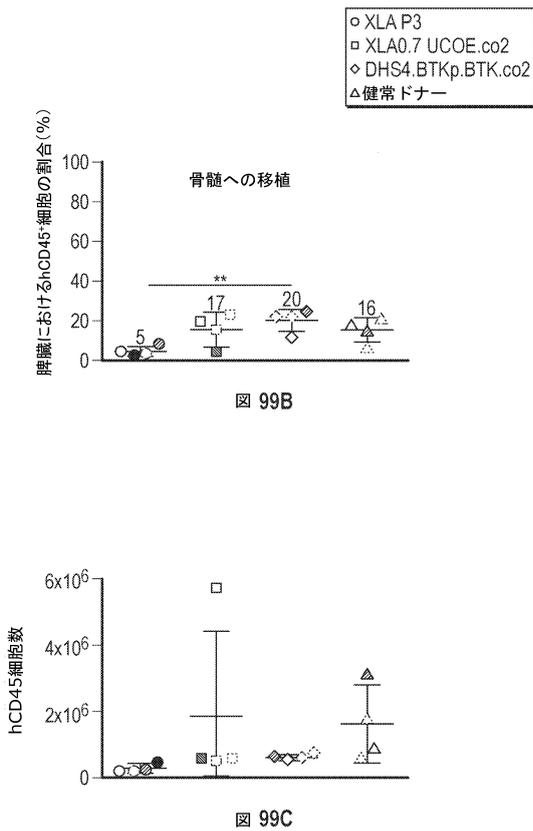
【 図 9 9 A 】



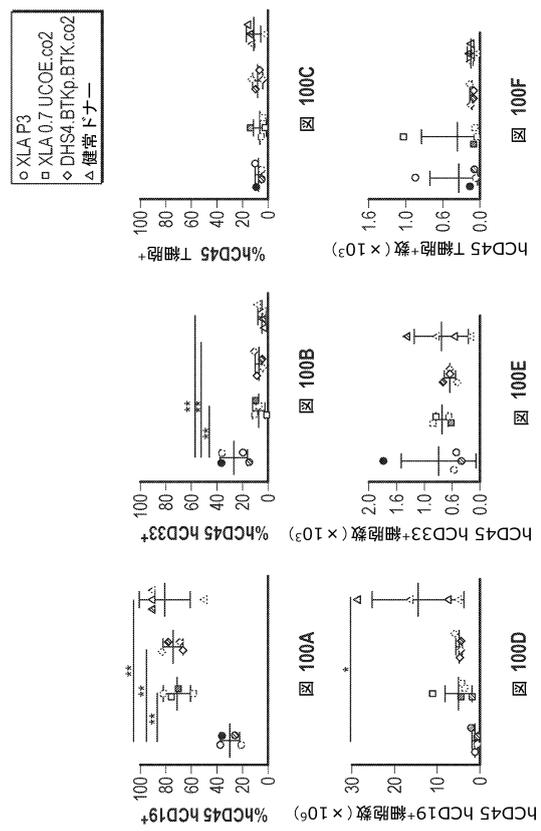
10

20

【 図 9 9 B - C 】



【 図 1 0 0 】



30

40

50

【 図 1 0 1 - 1 】

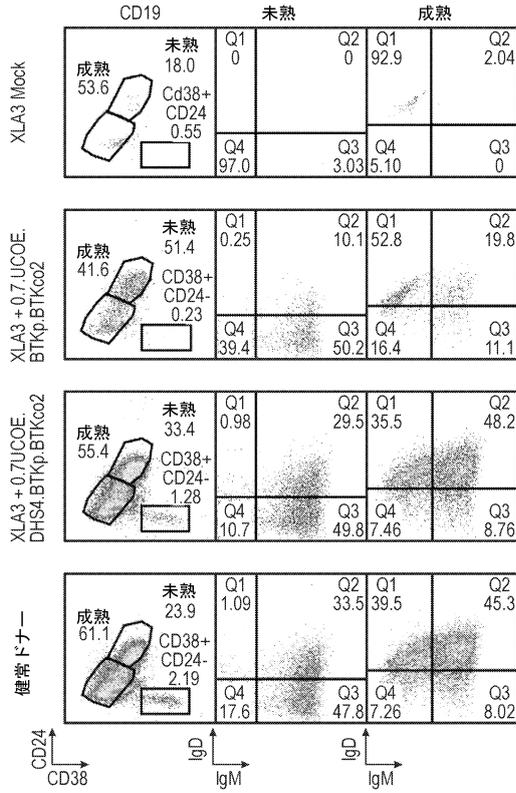


図 101-1

【 図 1 0 1 - 2 】

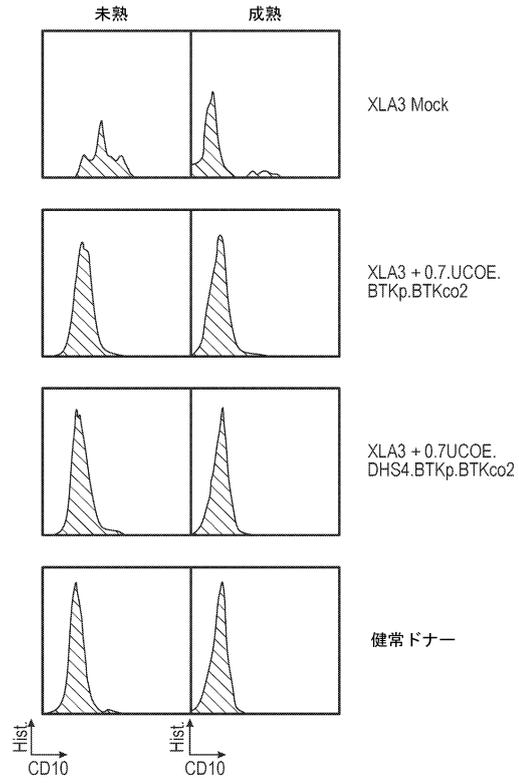


図 101-2

【 図 1 0 2 】

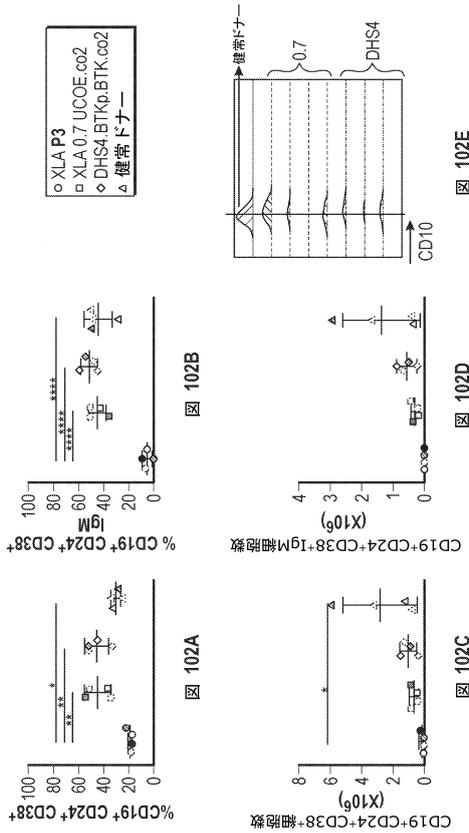


図 102E

図 102D

図 102C

【 図 1 0 3 A - F 】

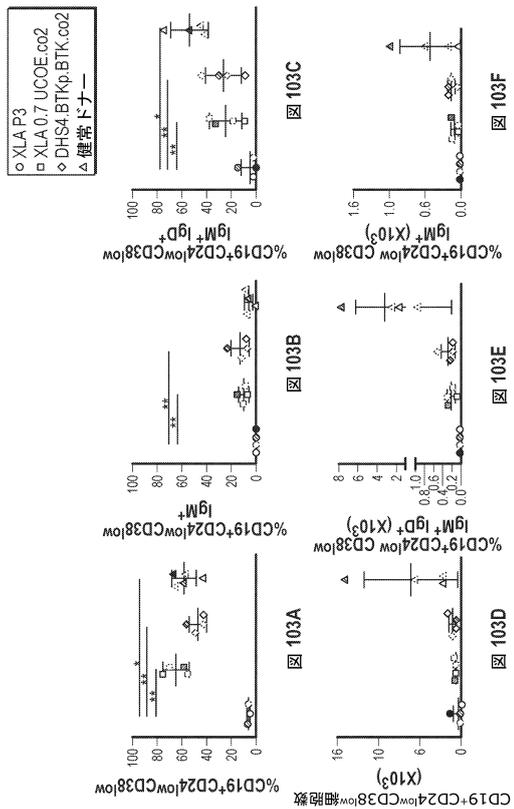


図 103C

図 103B

図 103A

図 103F

図 103E

図 103D

10

20

30

40

50

【 図 1 0 3 G 】

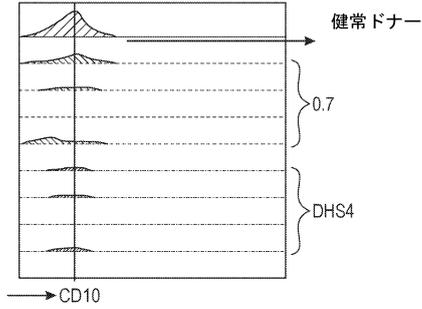
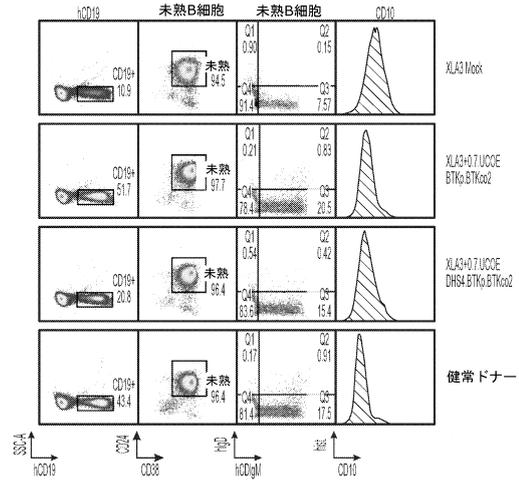


図 103G

【 図 1 0 4 】



10

【 図 1 0 5 】

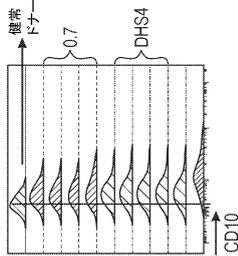
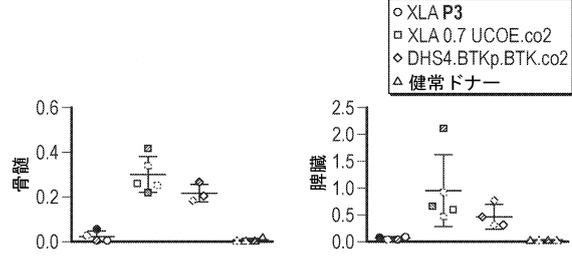


図 105E

【 図 1 0 6 】



20

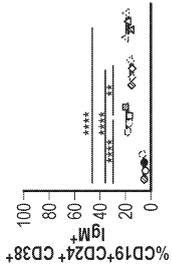


図 105B

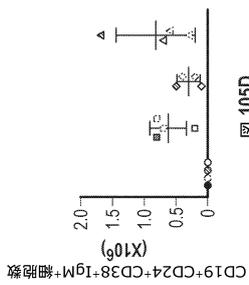


図 105D

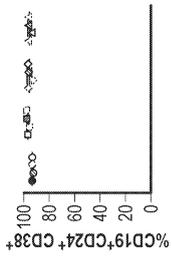


図 105A

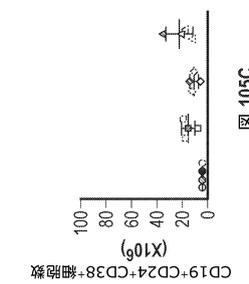


図 105C

図 106A

図 106B

組み込まれたウイルスコピー数：形質導入後のバルクCD34+細胞

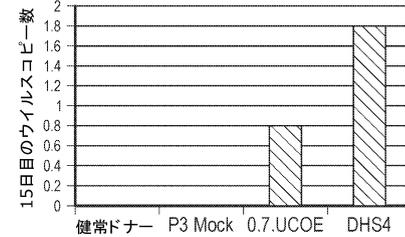


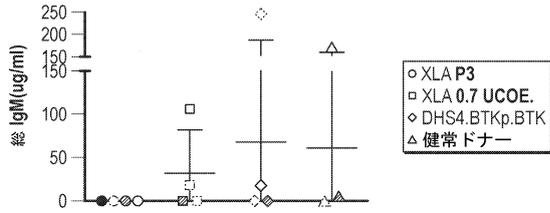
図 106C

30

40

50

【 図 1 0 7 】



【 図 1 0 8 A 】

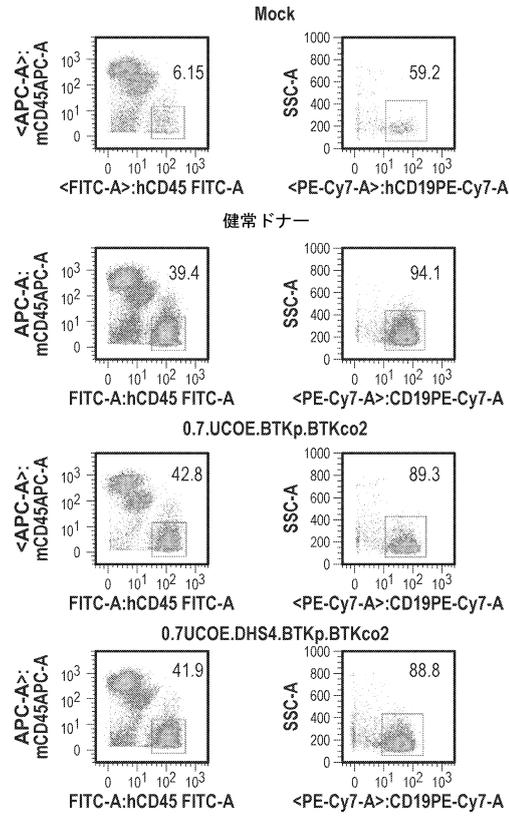


図 108A

10

20

【 図 1 0 8 B 】

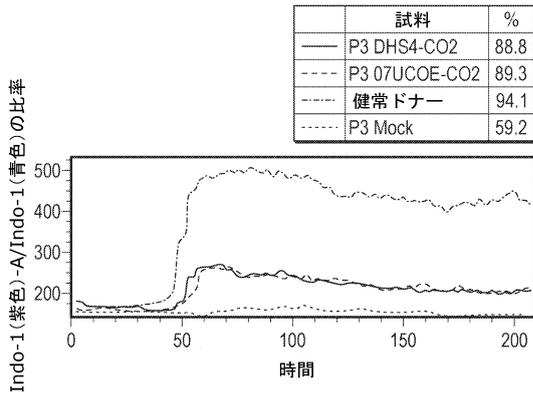


図 108B

【 図 1 0 9 】

方法: B細胞分化誘導プロトコル

3工程からなる形質細胞分化培養系:

出発細胞: NSGレシピエントの脾細胞 0.5×10^6 個

全工程を通して使用する基礎培地: 以下のサイトカインを添加したIMDM+10%FBS+BME

(第I相: 7日間) MegaCD40L (100ng/mL) + CpG ODN 2006 (1 μg/mL) + IL-2 (50ng/mL) + IL-10 (50ng/mL) + IL-15 (10ng/mL)

(第II相: 3日間) IL-2 (50ng/mL) + IL-6 (50ng/mL) + IL-10 (50ng/mL) + IL-15 (10ng/mL)

(第III相: 4日間) IL-6 (50ng/mL) + IL-15 (10ng/mL) + IFN-α 2B (100U/mL)

注: 1日目よりも後では培地量を2倍にし、 1×10^6 個/mLの細胞密度を維持すること

(または2日ごとに培地量を2倍に戻すこと);

サイトカインを交換する前にPBSで洗浄すること(特に工程Iと工程IIの間)。

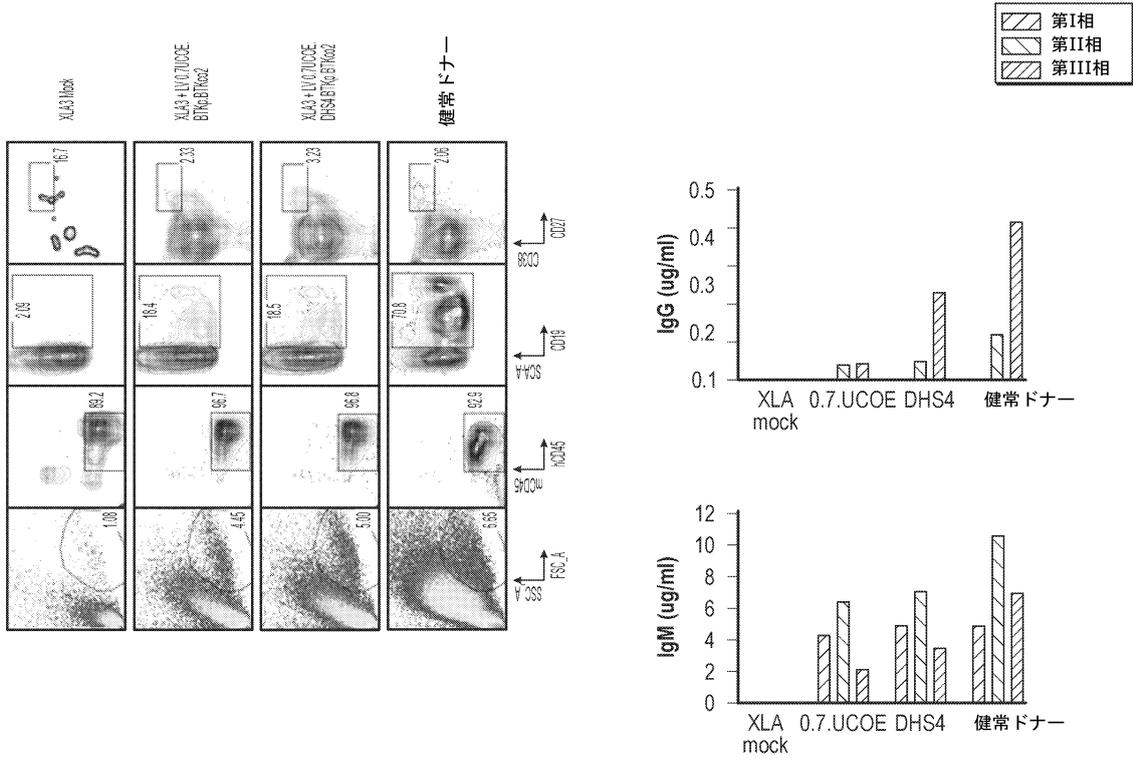
30

40

50

【 1 1 0 】

【 1 1 1 】



【配列表】

0007471821000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N	5/0781(2010.01)	F I	C 1 2 N	5/0781	
C 1 2 N	5/0789(2010.01)		C 1 2 N	5/0789	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)		C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/867(2006.01)		C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)		C 1 2 Q	1/04	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)		A 6 1 K	35/76	

1 4 2 9

(72)発明者

ソマー, カレン

アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0 2 シアトル, ユニット 2 0 2 マイナー アベニュー イ
ースト 2 2 0 0

(72)発明者

シン, スワティ

アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 0 2 9 イサクア, ユニット Q 6 セイ ブラック ナギット
ロード 2 3 1 2 0

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献

Nucleic Acids Research , 2015年 , vol.43, no.3 , p.1577-1592
Molecular Therapy , 2015年 , vol.23, suppl.1 , p.S93, 238
Molecular Therapy , 2011年 , vol.19, suppl.1 , p.S136, 349
Molecular Therapy , 2010年 , vol.18, suppl.1 , p.S133, 343
Molecular Therapy , 2010年 , vol.18, no.9 , p.1640-1649

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 0 0

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)

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

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q