

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4750285号  
(P4750285)

(45) 発行日 平成23年8月17日 (2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年5月27日 (2011.5.27)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 5/00 (2006.01)

A O 1 H 5/00 A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 3

請求項の数 12 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2000-615766 (P2000-615766)  
 (86) (22) 出願日 平成12年5月4日 (2000.5.4)  
 (65) 公表番号 特表2002-542828 (P2002-542828A)  
 (43) 公表日 平成14年12月17日 (2002.12.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/012380  
 (87) 国際公開番号 W02000/066743  
 (87) 国際公開日 平成12年11月9日 (2000.11.9)  
 審査請求日 平成19年4月27日 (2007.4.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/132,697  
 (32) 優先日 平成11年5月4日 (1999.5.4)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC 203981

(73) 特許権者 508233559  
 ケンタッキー バイオプロセッシング, リミ  
 ティド ライアビリティ カンパニー  
 アメリカ合衆国, ケンタッキー 4230  
 3, オーエンスボロ, エアパーク ドライ  
 ブ 3700  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス発現ベクター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

変更ウイルス移動タンパク質及び変更 1 2 6 / 1 8 3 レプリカ - ゼ複合体をコードする  
 、配列番号 2 全体を含む単離核酸配列。

【請求項 2】

前記変更 1 2 6 / 1 8 3 レプリカ - ゼ複合体が、その変更レプリカ - ゼ複合体を発現する  
 ウイルスに含まれるトランスジーンの安定性を高める、請求項 1 に記載の単離核酸配列  
 。

【請求項 3】

前記変更移動タンパク質が、その変更移動タンパク質を発現するウイルス内に含まれる  
 トランスジーンの安定性を亢進する能力を高める、請求項 1 又は 2 に記載の単離核酸配列  
 。

【請求項 4】

A T C C 受託番号第 2 0 3 9 8 1 号に寄託された B S G 1 0 5 7 と命名された、配列番  
 号 6 に示すアミノ酸配列を有する変更ウイルス移動タンパク質をコードする核酸配列を含  
 むウイルス・ベクター。

【請求項 5】

対照のウイルス・ベクターと比較して、ベクター内に含まれるトランスジーンを安定さ  
 せる高められた能力を示す、請求項 4 に記載のウイルス・ベクター。

【請求項 6】

10

20

前記ベクターがタバコ・モザイク・ウイルス・ベクターである、請求項 5 に記載のウイルス・ベクター。

【請求項 7】

前記トランスジーンが非ウイルス遺伝子である、請求項 6 に記載のウイルス・ベクター。

【請求項 8】

前記非ウイルス・トランスジーンが、膜タンパク質、細胞基質タンパク質、分泌タンパク質、核タンパク質、及びシャペロン・タンパク質から成る群から選ばれるタンパク質をコードする、請求項 7 に記載のウイルス・ベクター。

【請求項 9】

請求項 4 ～ 8 の何れか一項のベクターによって形質転換された細胞。

【請求項 10】

植物細胞である、請求項 9 の細胞。

【請求項 11】

請求項 4 ～ 8 の何れか一項のウイルス・ベクターを包むトランスジェニック植物。

【請求項 12】

配列番号 2 の単離核酸配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願のクロス・リファレンス

本願は、援用する継続中の1999年5月4日に出願されたプロビジョナル米国特許出願第60/132,697の優先権の利益を主張する。

【0002】

技術分野

この発明は、植物ウイルス学の分野に在る。とりわけ、本発明は、変更ウイルス移動タンパク質をコードする核酸配列の合成、上記タンパク質を発現するウイルスベクターの構築、及び上記ウイルス・ベクターに感染した宿主植物の生成に関する。前記ウイルス・ベクターは、局所的及び全身性の宿主への素早い侵襲を可能にし、そして着目のトランスジーンの安定した発現を可能にする。

【0003】

本発明の背景

ここ15年間、植物での外来遺伝子の発現においてかなりの進歩があった。外来タンパク質は、植物の改良又は抽出後に使用するタンパク質の生産のために現在日常的に多くの植物種において産生されている。植物の遺伝子操作のためのベクターは、いくつかの天然植物ウイルスから抽出されてきた。特定のタンパク質の産生のための、ウイルス・ベースのベクターを用いる植物内での外来遺伝子の一過性の発現は、いくつかの利点をもつ。植物ウイルスの産物は、植物において最も多く産生されるタンパク質の一つである。しばしばウイルス遺伝子の産物は、ウイルス複製の間は植物細胞内で産生される主なタンパク質となる。多くのウイルスは、最初の感染部位から植物のほとんど全ての細胞への全身的な（systemic）移動が可能である。それらの理由により、植物ウイルスは、植物内での外来遺伝子のための効率的な一過性の発現ベクターへと開発されてきた。多細胞植物のウイルスが比較的小さいのは、おそらく植物全体の全身性感染において隣接する細胞へのウイルスの移動をもたらす経路の大きさ制限の理由からであろう。植物発現ベクターが構築される前記植物ベクターの一つがTMV（タバコ・モザイク・ウイルス）である。TMVはタバモウイルス群の基準メンバーである。TMVは、一本鎖RNA分子の周りに巻きついた約2000ユニットの単キャプシド・タンパク質から成る直径4nmの中空管であって約300×18nmの直線管状ウイルス粒子をもつ。ウイルス粒子は、重量にして95%のタンパク質と5%のRNAである。TMVのゲノムは、5つのラージORFsを含む6395ヌクレオチドの一本鎖RNAで構成される。それぞれの遺伝子の発現は、独立して調節されている。ウイルスRNAは、126kDaのレプリカ・ゼン・サブユニット及び約5%の時間にあるアンバー終止コドンの読み過ぎることによって産

10

20

30

40

50

生される183kDaレプリカ - ゼ・サブユニットをコードする、5' 遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA) として使用できる。上記内在遺伝子の発現は、複製の間に産生される3' コターミナル・サブゲノムmRNAの合成を指令するマイナス・センスRNA上の異なるプロモーターによって制御されている。タバモウイルスの遺伝子発現及びライフ・サイクルの詳細な記載を、とりわけDawson and Lehto, Advances in Virus Research 38:307-342(1991)において見ることができる。

#### 【 0 0 0 4 】

従って、植物の遺伝子操作のための新規の、そして改良されたベクターを提供することは、科学的及び商業的に重要である。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 発明の詳細

本発明の主要な側面は、宿主植物内におけるトランスジーンの安定した発現に作用する変更移動タンパク質及び変更126 / 183ウイルス・タンパク質を発現する組換えウイルス・ベクターの構築である。

#### 【 0 0 0 6 】

したがって、本発明は、配列番号5又は6に示すアミノ酸配列を有する変更ウイルス移動タンパク質並びに変更126 / 183ウイルス・タンパク質をコードする単離核酸配列を提供する。一つの側面において、前記単離核酸配列は、配列番号3又は4に示した配列と基本的に同一であり、そして図1Aに示したとおり5213位にチミン (T) 又はウラシル (U) を、さらに5303位にグアニン (G) を含む。他の側面において、前記単離核酸配列は、配列番号3又は4に示す配列と同一である。前記30K移動タンパク質の改変及び前記126 / 183ウイルス・タンパク質の変更は、ウイルス・ベクターに含まれるトランスジーンの安定性を亢進する高められた能力を生じる。

#### 【 0 0 0 7 】

別の態様において、本発明は、配列番号 5 又は 6 に示すアミノ酸配列を有する変更ウイルス移動タンパク質並びに変更 1 2 6 / 1 8 3 ウイルス・タンパク質をコードする核酸配列を含むウイルス・ベクターを提供する。一つの側面において、前記ウイルス・ベクターは、対照ウイルス・ベクターと比較してベクター内に含むトランスジーンの安定性について高められた能力を表す。好ましくは、前記ベクターは、タバコ・モザイク・ウイルス・ベクターである。特に好ましいベクターは、BSG 1 0 5 7 と称される ( 1 9 9 9 年 4 月 2 8 日に受託番号第 2 0 3 9 8 1 号として A T C C に寄託された ) 。

#### 【 0 0 0 8 】

この態様の別の側面において、前記ウイルス・ベクターは、着目のトランスジーンを含む。好ましくは、トランスジーンは、膜タンパク質、細胞基質タンパク質、分泌タンパク質、核タンパク質、及びシャペロン・タンパク質から成る群から選ばれるタンパク質をコードする非ウイルス遺伝子である。

#### 【 0 0 0 9 】

本発明は、当該ウイルス・ベクターによって形質転換された細胞をも提供する。前記形質転換された細胞は、動物及び植物のものでありうる。好ましくは、前記細胞は、植物細胞である。本発明は、前記ウイルス・ベクターを含むトランスジェニック植物をさらに提供する。好ましいトランスジェニック植物は、例えばニコチアナ・ベンサムアナ (Nicotiana glauca) 又はニコチアナ・タバコム (Nicotiana glauca) でありうるが、他のものが当業者により容易に代用されうる。

#### 【 0 0 1 0 】

##### 本発明の実行様式

この開示の全体にわたって、各種刊行物、特許、及び公開特許明細書が、引用法により示す。それらの刊行物、特許、及び公開特許明細書の開示は、この発明に関する技術様相のより完全な記載のために、本明細書により本開示に援用される。例えば、植物への全体的感染及びそれらからの異種タンパク質の発現のためのウイルス植物ベクターの構築及びそれらの使用についての一般的な教示は、米国特許第5,316,931号；第5,977,438号；第5,88

10

20

30

40

50

9,191号；第5,889,190号；第5,866,785号；及び第5,816,653号に開示され、全ての開示が本明細書により援用される。

【0011】

一般的な技術：

本明細書の実施には、別に指示されない限り、本技術分野の技術の範囲内の免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノム科学、及び組換えDNAの慣用技術を必要とする。例えば、PLANT VIROLOGY, 3<sup>rd</sup> edition(1991); Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2<sup>nd</sup> edition(1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.Ausubel, et al.eds., (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH(M.J.MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds.(1995)), Harlow and Lane, eds.(1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE(R.I.Freshney, ed.(1987))を参照のこと。

10

【0012】

明細書及びクレーム中で用いられるとき、単数形「a」、「an」、及び「the」は、その文脈が明らかに別のことを指示しない限り複数のものをも含む。例えば「a cell」は、それらの混合物を含めて、複数の細胞を含む。

【0013】

定義：

「植物細胞 (plant cell)」は、プロトプラスト及び細胞壁から成る植物の構造的、そして生理学的単位を指す。

20

【0014】

「プロトプラスト (protoplast)」は、細胞培養、植物組織又は植物全体において再分化する可能性をもつ、細胞壁をもたない単離された細胞である。

【0015】

「宿主 (host)」は、ベクター又はウイルスの核酸の複製が可能であり、さらにウイルス・ベクター又はウイルスの核酸を含むウイルスによって感染させることが可能である細胞、組織又は生物体を包含する。この用語は、原核生物及び真核生物の細胞、器官、組織、生物体又は適合するそれらの細胞外抽出物を含むことが意図される。好ましい宿主細胞は、植物細胞である。

30

【0016】

用語「感染 (infection)」は、転移させる工程又はウイルスの核酸が複製され、ウイルスのタンパク質が合成され又は新しいウイルス粒子が組み立てられるところのその核酸を宿主に転移させるウイルスの能力を指す。

【0017】

タバコ・モザイク・ウイルスの「移動タンパク質 (movement protein)」は、植物内におけるRNAレプリコン又はウイルスの細胞間移動のために必要とされる非キャプシド・タンパク質である。

用語「核酸配列 (nucleic acid sequence)」、「ポリヌクレオチド (polynucleotide)」、「ヌクレオチド (nucleotides)」、及び「オリゴヌクレオチド (oligonucleotides)」は、互換性をもって使用される。それらは、あらゆる長さのヌクレオチドの重合体の形状、デオキシリボ核酸又はリボ核酸のいずれか、それらのアナログを指す。ポリヌクレオチドは、さまざまな三次元構造をもち、既知または未知のさまざまな機能を実行しうる。以下の：遺伝子または遺伝子断片のコードまたは非コード領域、連鎖解析から定義される遺伝子座 (loci) (遺伝子座 (locus))、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボゾームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、あらゆる配列の単離されたDNA、あらゆる配列の単離されたRNA、核酸プローブ、及びプライマーは、制限することのないポリヌクレオチドの例である。ポリヌクレオチドは、修飾したヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド・アナログを含みうる。存在するならば、ヌクレオチ

40

50

ド構造に対する修飾は、前記重合体の組み立て前または後になされうる。前記ヌクレオチドは、非ヌクレオチド成分により妨げられうる。ポリヌクレオチドは、重合の後、例えば標識化成分との複合体形成によりさらに修飾されうる。

【0018】

「遺伝子 (gene)」は、転写及び翻訳された後に特定のタンパク質をコードすることが可能である少なくとも一つのオープン・リーディング・フレームを含むポリヌクレオチドを指す。

【0019】

本明細書で用いられる場合、「発現 (expression)」は、ポリヌクレオチドをmRNAに転写する過程及び/又はそれに引き続いて(「転写産物 (transcript)」ともいわれる) 転写されたmRNAをペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳する過程を指す。前記転写産物及び前記コードされるポリペプチドは、まとめて遺伝子産物といわれる。前記ポリヌクレオチドがゲノムDNA由来の場合、発現には真核生物細胞におけるmRNAのスプライシングが含まれるであろう。

【0020】

ポリヌクレオチドにおいて、「直鎖状配列 (linear sequence)」又は「配列 (sequence)」は、ポリヌクレオチドにおける5' から3' 方向において一定の順番のヌクレオチドであって、ここで前記配列においてお互いに隣り合っている残基はそのポリヌクレオチドの一次構造において隣接している。

【0021】

ヌクレオチドの直鎖状配列は、両配列が同じ相補的ポリヌクレオチドと二重鎖を形成するハイブリッド形成が可能である場合、他の直鎖状配列と「本質的に同一 (essentially identical)」である。非常なストリンジェンシーの条件下でハイブリッド形成する配列がより好ましい。ハイブリッド形成反応は、前記ヌクレオチド配列の挿入、欠失、及び置換を受け入れると理解される。したがって、ヌクレオチドの直鎖状配列は、たとえばいくつかのヌクレオチド残基が正確に一致又は整列させなくても本質的に同一であることができる。一般的に、約40ヌクレオチドの長さの本質的に同一な配列は、約30 において10×SSC (0.15M塩化ナトリウム、15mMクエン酸緩衝液) 中でハイブリッド形成する；好ましくは、それらは約40 において6×SSC中でハイブリッド形成する；より好ましくは、それらは約50 において6×SSC中でハイブリッド形成する；さらにより好ましくは、それらは約60 において6×SSC中で又は約40 において0.5×SSC中で又は約30 において50%ホルムアミドを含む6×SSC中でハイブリッド形成する；よりいっそう好ましくは、それらは40 以上において50%以上のホルムアミドが存在する2×SSC以下の濃度のSSC中でハイブリッド形成する。前記試験の厳密さは、部分的に前記ポリヌクレオチドの長さの関数であると理解されうる；このことから同じ相同性をもつより短いポリヌクレオチドはより低いストリンジェンシーの下、試験されるべきであり、それぞれに応じて条件が調節される。ハイブリッド形成のストリンジェンシー、配列一致の程度、そしてポリヌクレオチドの長さの間の関係は、本分野において知られ、そして標準式により算出されうる；例えばMeinkoth et al. を参照のこと。本発明のものと一致するか又はより近くに整列する配列は、同様に好ましい。一般に、本質的に同一な配列は、相同領域の整列後、お互いに少なくとも約50 %同一である。好ましくは、前記配列は少なくとも約60%同一である；より好ましくは、それらは少なくとも約70%同一である；より好ましくは、それらは少なくとも約80%同一である；より好ましくは、それらは少なくとも約90%同一である；さらにより好ましくは、それらは少なくとも約95%同一である；いっそうより好ましくは、前記配列は少なくとも約100%同一である。

【0022】

ポリヌクレオチド配列が本質的に同一であるかどうかを決定するに際し、それと比較される前記ポリヌクレオチドの機能を保存する配列が特に好ましい。機能は、さまざまな基準、例えば標的ポリヌクレオチドとのハイブリッド形成能及び前記ポリヌクレオチドが同一の又は本質的に同一のポリペプチドをコードするかどうかによって確立されうる。したが

10

20

30

40

50

って、コードされるポリペプチドにおける非保存的置換を引き起こすヌクレオチド置換は、好ましくは終止コドンを生じるヌクレオチドの置換である；コードされるポリペプチドにおける保存性置換を引き起こすヌクレオチド置換はより好ましく、そしてヌクレオチド配列が一致することはさらに好ましい。前記ポリペプチド内の挿入又は欠失をもたらす前記ポリヌクレオチドにおける挿入又は欠失は、相がずれて翻訳される下流のコード領域をもたらすものよりも好ましい。

#### 【 0 0 2 3 】

ポリヌクレオチドに用いられる用語「ハイブリッド形成 (hybridize)」は、ハイブリッド形成反応においてヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化させる複合体を形成するポリヌクレオチドの能力を指す。前記水素結合は、ワトソン - クリック型塩基対、フーグスティーン型結合又はその他の配列固有の様式で起こりうる。前記複合体は、2本の鎖が形成する二重鎖構造、3本以上の鎖が形成する多鎖複合体、1本での自己ハイブリッド形成鎖又はそれらのいくつかの組合せを含みうる。

10

#### 【 0 0 2 4 】

細胞性タンパク質に用いる用語「細胞基質の (cytosolic)」、「核の (nuclear)」、「分泌 (secreted)」は、その細胞性タンパク質が主の局在している細胞外及び/又は細胞内の位置を特定する。ある種のタンパク質「シャペロン (shaperons)」は、細胞の基質と核の間を縦横に転移することができる。

#### 【 0 0 2 5 】

「対照 (control)」は、比較目的のための実験において用いられる他の対象又はサンプルである。例えば実験目的がウイルス・ベクターが保有する変異移動タンパク質が宿主への全身性侵襲において高められた能力を備えているかどうか確認する実験の場合、野生型の変異移動タンパク質 (例えば図2に示す1037配列) を発現する対照ベクター (例えば図1-2に示すBSG1037) を用いることが一般的に好まれる。

20

「細胞株 (cell line)」又は「細胞培養 (cell culture)」は、細菌、植物、昆虫又は高等真核生物の細胞をインビトロにおいて育成又は維持することを意味する。細胞の子孫は、前記親細胞と (形態学的、遺伝子型的又は表現型的のいずれにおいても) 完全に一致することはありえない。

#### 【 0 0 2 6 】

「ベクター (vector)」は、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、宿主細胞内にデリバリーされるポリヌクレオチドを含む組換えプラスミド又はウイルスを指す。前記デリバリーされるポリヌクレオチドは、遺伝子治療に係るコードされた配列を含みうる。核酸分子、好ましくは自己複製する核酸分子を、挿入した核酸分子を宿主細胞内及び/又は間に転移させる。前記用語は、細胞内へのDNA又はRNAの挿入のために主に機能するベクター、DNA又はRNAの複製のために主に機能する複製ベクター、及びDNA又はRNAの転写及び/又は翻訳のために機能する発現ベクターを含む。前記機能を一つ以上提供するベクターも含まれる。

30

#### 【 0 0 2 7 】

「レプリコン (replicon)」は、適当な宿主細胞内においてそのポリヌクレオチドの複製をもたらす (一般的に ori 配列と表される) 複製起点を含むポリヌクレオチドを指す。レプリコンの例は、クロモソーム (例えば核又はミトコンドリアのクロモソーム) と同様に、エピソーム (例えばプラスミド) を含む。

40

#### 【 0 0 2 8 】

「転写単位 (transcription unit)」は、遺伝子又はその断片の転写を導くことを可能にするDNAセグメントである。典型的には、転写単位は、転写される遺伝子又はDNA断片に使用できるように連結されたプロモーター及び前記転写される遺伝子又は断片の開始部位又は終止部位の上流又は下流のいずれかに位置した任意の調節配列を含む。

#### 【 0 0 2 9 】

#### 本発明の核酸

本発明は、宿主植物内におけるトランスジーンの安定な発現に作用する変異移動タンパク

50

質及び変更126/183ウイルス・タンパク質を発現する組換えウイルス・ベクターを包含する。先に記載した移動タンパク質と異なり、前記変更タンパク質（104位のスレオニン残基をイソロイシンと置き換え、そして134位のリジン残基をアルギニンと置き換えた、図2を参照のこと）は、2つのアミノ酸置換を含む。前記変更ウイルス・ベクターは、変更移動タンパク質を発現するウイルスに含まれるトランスジーンの安定性を亢進する高められた能力を示す。

【0030】

一つの態様において、本発明は、配列番号5又は6に示すアミノ酸配列を有する変更ウイルス移動タンパク質及び変更126/183ウイルス・タンパク質をコードする単離核酸配列を提供する。この態様の一つの側面において、前記移動タンパク質の単離核酸配列は、配列番号3に示す配列と本質的に同一であり、そしてそれは図1Aに示すとおり5213位にチミン（T）又はウラシル（U）残基を、そして5303位にグアニン（G）を含む。本明細書において用いられるとき、両配列が同じ相補的ポリヌクレオチドと二重鎖を形成するハイブリッド形成が可能である場合、ヌクレオチドの直鎖状配列は、もう一方の直鎖状配列と「本質的に同一」である。

【0031】

ハイブリッド形成は、さまざまな「ストリンジェンシー（stringency）」条件下で実施されることができる。適切な条件は、温度、イオン強度、インキュベーション時間、反応混合物中の付加的な溶液、例えばホルムアミドの存在及び洗浄手順を含む。より高いストリンジェンシー条件は、より高い温度とより低いナトリウム・イオン濃度であり、安定なハイブリッド形成複合体の形成のためにハイブリッド形成要素間のより高い最小相補性が求められる上記の条件である。一般に、ストリンジェンシーの低いハイブリッド形成反応は、約40 において6×SSC中で又は等価のイオン強度/温度の溶液において行われる。適度なストリンジェンシーのハイブリッド形成は、典型的には約50 において6×SSC中で行われ、そしてストリンジェンシーの高いハイブリッド形成反応は、一般的に約60 において6×SSC中で行われる。前記基本的に同一な核酸配列の本発明の態様は、望ましい構造的特徴（つまり、スレオニン<sub>104</sub>をイソロイシンへ、そしてリジン<sub>134</sub>をアルギニンへの置換の保存）に有意な変化をもたらさない保存性又は非保存性置換を含む変更移動タンパク質をコードする全ての配列を包含する。それらの該当する核酸配列を変更することによるポリペプチドの修飾は、本技術分野において日常的な操作である。

【0032】

互いに保存的に置換されることができるアミノ酸残基は、グリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/スレオニン；リジン/アルギニン；及びフェニルアラニン/チロシンに限らず含む。コードされるアミノ酸配列が変化しない核酸配列の変化は、一般的に好まれる。

【0033】

前記組換えウイルス・ベクターのこの発明の態様は、先に記載したウイルス移動タンパク質をコードする核酸を含む。

【0034】

一つの態様において、核酸は、宿主植物内に導入される。好ましくは、前記核酸は、本技術分野において知られる技術、さらに好ましくはこれら全ての開示が本明細書によって援用される米国特許第5,316,931号；第5,977,438号；第5,889,191号；第5,889,190号；第5,866,785号；及び第5,816,653号に記載の技術を用いてウイルス核酸の代わりに導入される。前記組換えウイルス核酸は、前記宿主植物内において上記非天然配列の維持及び転写に安定である。

【0035】

BSG1057（配列番号2）は、BSG1037（配列番号1）の変異バージョンである。BSG1057及びBSG1037の完全配列を、図5及び図6に示す。BSG1037は、挿入物を維持する特性を改善された。

【0036】

これら2つのウイルス・ベクターの間の違いは、緑色蛍光タンパク質（GFP）リポーター遺伝子によって最もよく説明される。BSG1037とBSG1057の両者は、その緑色蛍光により低波長のUV光下で可視化されうるGFPを発現する。GFP活性の存在は、前記組換えウイルスが遺伝子を発現している細胞を確認するのに役立つ。

【 0 0 3 7 】

BSG1037及びBSG1057を接種したニコチアナ・ベンサミアナを、接種後約4～5日で長波長UV光下で観察した。BSG1057ウイルスを接種した植物の葉におけるGFPスポットが、BSG1037ウイルスを接種した植物の葉におけるGFPスポットに比べ、顕著に大きいことは、上記1057ウイルスがBSG1037に比べて細胞間の移動が早いことを示唆している。

【 0 0 3 8 】

BSG1037とBSG1057間の配列比較

1037と1057間の前記特定のヌクレオチドの変化を、以下の表中に列挙する。アミノ酸の変化を生じる前記ヌクレオチドの変化である場合において、変化が（一文字表記を用いて）記述される。

【 0 0 3 9 】

【表 1】

nt位	1037nt	1057nt	1037AA	1057AA
1138 (126/183)	A	G	E	G
1268 (126/183)	T	C	アミノ酸変化なし	
2382 (126/183)	A	G	K	E
3632 (126/183)	G	A	アミノ酸変化なし	
5213 (mp)	C	T	T	I
5303 (mp)	A	G	K	R
5896 (mp)	C	A	アミノ酸変化なし	

126/183は、前記126/183ウイルス・タンパク質を指す。

MPは、前記運動タンパク質を指す。

【 0 0 4 0 】

本発明のベクターにより転写されるトランスジーンは、生物学的な存在物内で発現されるあらゆる遺伝子であることができる。トランスジーンを選択は、前記ベクターの意図される目的によっておおむね決定される。好ましくは前記トランスジーンは、膜タンパク質、細胞基質タンパク質、分泌タンパク質、核タンパク質、及びシャペロン・タンパク質から成る群から選ばれる非ウイルスの遺伝子である。

【 0 0 4 1 】

この発明において実施された前記ベクターは、組換えクローニング法の使用及び/又は化学合成により得ることができる。莫大な数の組換えクローニング技術、例えばPCR、制限エンドヌクレオチドレアーゼ消化及びライゲーションは、本技術分野において周知であり、そのため本明細書で詳細に記載される必要はない。当業者は、本明細書より提供される又は本技術分野において利用できるあらゆる合成手段により、望ましいベクターを得るための公若しくは私有のデータベースの配列情報を使用することもできる。

【 0 0 4 2 】

本発明の宿主細胞及び標的

本発明は先に記載したウイルス・ベクターにより形質転換した宿主細胞を提供する。前記宿主細胞は、動物又は植物でありうるが、植物宿主が好ましい。着目のトランスジーンを含むウイルス・ベクターは、エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム

10

20

30

40

50



、リン酸カルシウム、DEAE - デキストラン又は他の物質を用いるトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；及び（前記ベクターを感染作用物質と組み合わせる）感染を含む多くの適切な手段によって好適な真核生物細胞内に導入されることができる。導入するベクターの選択は、しばしば前記宿主細胞の特徴に依存する。

#### 【0043】

植物細胞のために、それらの一般的な方法に由来するさまざまな技術は、本技術分野において利用できる。例えば米国特許第5,316,931号；第5,977,438号；第5,889,191号；第5,889,190号；第5,866,785号；及び第5,816,653号を参照のこと。前記宿主細胞は、植物全体、単離した細胞又はプロトプラストの形態でありうる。植物細胞内にベクターを導入する方法の実例は、アグロバクテリウムを介した植物の形質転換、プロトプラストの形質転換、花粉内への遺伝子転移、生殖器内への注入及び未成熟胚への注入、葉の擦過、溶液中での擦過、高速水スプレー、その他の宿主の損傷、並びに組換えウイルスRNA又は組換え植物ウイルスを含む水を宿主の種子へ吸収させることを含む。当業者には明白であるが、これらの方法のそれぞれは、さまざまな利点と欠点を持つ。したがって、特定の植物種へのある特定の遺伝子導入法が、必ずしも他の植物種にとって最も効果的であるとはいえない。

#### 【0044】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) を介した転移は、植物細胞内への遺伝子の導入に広く適用可能な系である。なぜなら前記DNAは植物全体の組織内に導入されることができ、プロトプラストから完全な植物への再生の必要を回避するからである。植物細胞内へのDNA導入のためのアグロバクテリウムを介した発現ベクターの使用は、本技術分野において周知である。この技術は、宿主細胞内にそのDNAの一部（前記T-DNA）を転移し、そこでそれがヌクレオチドDNAに組み合わせられることによりコロニーを形成するアグロバクテリウムの一般的な特徴を使用する。前記T-DNAは、25塩基対の長さの境界配列によって定義され、そしてこれらの境界配列の間のあらゆるDNAが同様に植物細胞に転移される。前記T-DNA境界配列間の組換え植物ウイルス核酸の導入が前記植物細胞への前記組換え植物ウイルス核酸の転移を生じる場合に、前記組換え植物ウイルス核酸は、複製され、そしてその植物全体に浸透移行的に広がる。アグロ感染は、ジャガイモやせいもウイロイド (PSTV) (*Gardner et al., Plant Mol. Biol.* 6:221(1986))、CaV(Grimsley *et al.*, and Lazarowitz, S., *Nucl. Acids Res.* 16:229(1988))、ジギタリア・ストリーク・ウイルス (*digitaria streak virus*) (*Donson et al., Virology* 162:248(1988))、ウィート・ドwarf・ウイルス (*wheat dwarf virus*)、及びトマト・ゴールデン・モザイク・ウイルス (TGMV) により達成される。したがって、感受性植物のアグロ感染は、先のウイルスのいずれかのヌクレオチド配列に基づいた組換え植物ウイルス核酸を含むウイルス粒子により達成されることができた。微粒子銃若しくはエレクトロポレーション又は本技術分野において知られる他の方法も使用されうる。

#### 【0045】

全ての植物が本来アグロバクテリウムの宿主であるとは限らないため、他に取りべき方法、例えばプロトプラストの形質転換が前記宿主細胞内への当該ベクターの導入に用いられうる。ある単子葉植物について、その植物のプロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム沈澱ポリエチレン・グリコール処理、エレクトロポレーション、及びそれらの処理の組合せに基づく方法の使用により達成される。例えばPotrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:169-177(1985); Fromm *et al.*, *Nature*, 319:791(1986); 及びCallis *et al.*, *Genes and Development*, 1:1183(1987)を参照のこと。これらの技術の別の植物種への適用可能性は、プロトプラストからのその植物種への再生の可能性に依存するであろう。プロトプラストからの穀類の再生のためのさまざまな方法は、本技術分野において知られている。プロトプラストの形質転換に加えて、微粒子銃が、植物宿主細胞内に本発明のウイルスをデリバリーするために他に取りべき、そして簡便な技術である。具体的に言うと、前記植物細胞は、多数の当該ベクターによりコートされた微粒子を照射されるであろう。DNAコートした微粒子の照射は、植物と動物のいずれにおいても安定な組換え体の産生に首尾よ

10

20

30

40

50

く用いられている（例えばSanford et al.(1993)Methods in enzymology, 217:483-509を参照のこと）。植物細胞内へのベクター導入に好適な微粒子は、典型的には金属でできおり、好ましくはタングステン又は金でできている。それらの微粒子は、例えばバイオラド社製のもの（例えばバイオラド社のPDS-1000/He）で使用できる。当業者は、パラメーター、例えばヘリウム圧、コート粒子の量、マクロキャリアとストッピング・スクリーンの距離及びストッピング・スクリーンから前記目標までの飛程を修正することによりあらゆる植物に対し最適化できる微粒子銃のプロトコールを知っているであろう。

#### 【0046】

Zhou et al., Methods in enzymology, 101:433(1983)に記載のように花粉内への直接的なDNA転移によりベクターを植物内に導入することもできる。しばしば、植物細胞内への核酸導入技術は以下のようなものを含む：

(a) 手による接種。手による接種は、セライト（商標）又はカーボランダム（商標）（通常約1%）を加えた中性pH、低モル濃度のリン酸緩衝液を用いて行われる。1～4滴の前記調合液を葉の表面に滴下し、そして緩やかにこする。

(b) 苗床への機械的接種。苗床への機械的接種は、トラクター駆動の草刈り機がその葉を刈る間に前記ベクター溶液を（ガス駆出）噴霧することにより行われる。あるいは、前記苗床を、刈り、そして前記刈った葉の上に前記ベクター溶液を噴霧する。

(c) 一枚の葉（single Leaves）への高圧噴霧。単独の植物（Single plant）への接種は、狭い範囲で葉に噴霧することにより行われることもでき、（50psi（約344.7kPa）、前記葉から6～12インチ（15.24～30.48cm）の）指示された噴霧は、前記緩衝化したベクター溶液に約1%のカーボランダム（商標）を含む。

(d) 真空接種。接種は感染を促進するために宿主細胞を十分な減圧環境に晒すことにより達成されうる。

#### 【0047】

一旦、好適な宿主細胞内へ導入されれば、本技術分野において知られたいくつかのアッセイを用いることで前記トランスジーンが発現を測定されることができ。例えば、前記トランスジーンの転写されたセンス又はアンチセンス鎖の存在は慣用のハイブリッド形成アッセイ（例えばノザン・プロット分析）、増幅手順（例えばRT-PCR）、SAGE（米国特許第5,695,937号）、及び配列に基づく技術（例えば例えば米国特許第5,405,783号；第5,412,087号；及び第5,445,934号を参照のこと）によって検出及び/又は定量化されうる。

#### 【0048】

前記トランスジーンが発現は、前記タンパク質産物を調べることによっても確認されうる。本技術分野におけるタンパク質の分析のためのさまざまな技術が利用できる。それらは、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベント検定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線検定法、（例えば金コロイド、酵素又は放射性物質標識を用いる）インサイチュウ・イムノアッセイ、ウエスタン・プロット分析法、免疫沈降検定法、免疫蛍光分析法、及びPAGE-SDSを含むが、これらに限ったものではない。

#### 【0049】

一般的に、前記タンパク質レベルの確認は、(a) ポリペプチドを含む生物学的サンプルの準備；(b) トランスジーン産物に反応性の抗体とサンプル中の成分の間に生じる免疫特異的な結合の量を計測することを含む（その免疫特異的な結合の量は、発現したタンパク質のレベルを示す）。前記トランスジーンタンパク質産物を特異的に認識し、そして結合する抗体は、免疫検定法のために必要とされる。そしてそれらは、商業的な販売業者から入手されるか又は本技術分野における周知の方法で産生され、そしてスクリーニングされる。上記Harlow and Lane(1988)及び上記Sambrook et al.(1989)を参照のこと。試験タンパク質の前記サンプルは、前記真核生物の形質転換体（例えば植物細胞）又はそれらの子孫の均質化、そして場合により界面活性剤、好ましくは非還元型界面活性剤、例えばトリトン及びジギトニンを用いた前記試験タンパク質の可溶化により調製されうる。前記試験タンパク質が、前記検出抗体と相互作用しうる結合反応は、溶液中で又は固形の組織サンプル、例えば組織切片又は前記試験タンパク質が固定された固形担体上で行われうる

。前記複合体の形成は、本技術分野において知られる多くの技術により検出されうる。例えば、前記抗体は、標識して与えられ、そして未反応の抗体は前記複合体から除かれる；残留している標識の量により形成された複合体の量が示す。植物の形質転換体又はそれらの子孫からのサンプルにおける前記いくつかのアッセイを用いて得られた結果は、対照としての非形質転換起源のものと比較される。

#### 【0050】

この発明の真核生物宿主細胞は、前記トランスジーンの発現を生じるのに適した条件下で育てられる。前記宿主細胞は、組換え生物、例えば本発明における形質転換DNAベクターを含む組換え植物を製造するためにも利用されうる。好ましい宿主細胞は、組織又は完全な生物に再生する性向を持つ。これらの好ましい宿主細胞の例は、本明細書により例示すいくつかの植物細胞を含む。

10

#### 【0051】

したがって、この発明は、当該ベクターを持つ組換え植物を提供する。単独の植物のプロトプラスト又はさまざまな外植片のいずれかからの植物の再生は、本技術分野において周知である。例えばMethods for Plant Molecular Biology, A. Weissbach and H. Weissbach, eds., Academic Press, Inc., San Diego, Calif.(1988)を参照のこと。この再生及び生育の工程は、形質転換体細胞及びシュートの選択、形質転換シュートの定着、そして土での前記苗の育成のステップを含む。

#### 【0052】

アグロバクテリウム・ツメファシエンスにより導入された当該ベクターを含む植物の葉の外植片からの再生は、Fraley et al/, Proc.Natl.Acad.SciU.S.A., 80:4803(1983)に記載されるように達成されうる。この手順において、形質転換体は、選択剤の存在下、そして形質転換された植物種においてシュートの再生を促進する培地中で育てられる。この手順は典型的には2~4週間以内にシュートを生じ、そして次にこれらの形質転換体シュートは、選択剤及び細菌の増殖を予防する抗生物質を含む適切な根誘導培地に移される。苗を形成するために選択剤の存在下で根付いた形質転換体シュートは、次に根の産生のために土に移される。当業者の一人であれば通常明白であるようにこれらの手順は、利用される個々の植物種に依存して修正される。

20

#### 【0053】

子孫の個体群は、交雑受精及び無性生殖を含めた本技術分野において周知の方法により第1世代及び第2世代形質転換体から製造されうる。本発明において例示す組換え植物は、望ましいタンパク質の製造及び遺伝子の生物学的機能の分析のための試験系として有用である。

30

#### 【0054】

##### 実施例

BSG1037ウイルス又はBSG1057ウイルスを接種したタバコは、いずれかのウイルスに感染している細胞内に前記リポーター遺伝子(GFP)を発現する。(ウイルスの存在を示す)前記リポーター遺伝子活性は、長波長UV光により植物を照らすことで容易に観察される。前記導入したgfp遺伝子の発現を失ったウイルスは、もはや前記GFPタンパク質を蓄積することがないのでUV照明下でGFP蛍光を発することはない。

40

#### 【0055】

前記新規ベクター内の外来遺伝子の発現の安定性を評価するために、前記gfp遺伝子を(BSG1037を作り出す)前記標準ベクター及び(BSG1057を作り出す)改良されたベクター内に導入した。これらの構築物のRNA転写物を産生し、そしてニコチアナ・ベンサミアナへの接種に用いた。接種後約7日目に、広範囲の全身的なGFP発現を観察した。GFP発現組織を採取して、リン酸緩衝液中ですりつぶして、低速遠心分離により前記細胞片を除去して、そして得た「グリーン・ジュース」上清溶液を新規の一群のN.ベンサミアナへの接種に用いた。組織全体を約7日目に再度採取し、そして得たグリーン・ジュースを一連のウイルスの継代培養に用いた。前記手順を一連のウイルスの継代培養に合計7回用いた。N.ベンサミアナにBSG1037及びBSG1057の前記第1世代継代グリーンジュースと前記第7世代継代

50

グリーンジュースを平行して接種するところの比較を次に開始した。前記第1世代継代ウイルスは、接種後約4日目にGFPの優れた全身性発現の開始をもたらした。前記BSG1037の第7世代継代ウイルスは、わずかな全身性GFP発現と挿入した配列のほとんど又は全てを失ったベクターの特徴を示す強いウイルスTMVモザイク症状をもたらした。それに反して、前記BSG1057の第7世代継代ウイルスは優れた全身性GFP発現及びその導入された遺伝子を保持しているベクターの特徴を示すわずかに見えるウイルス性症状をもたらした。

#### 【0056】

接種の20日後、前記植物を地上2インチ(5.08cm)で切断し、そして再生長させた。植物を切断後3週間まで前記新しい組織全体の中のGFPタンパク質の蓄積について観察した。BSG1037ウイルスを含む植物は、(第1世代及び第7世代継代の両方とも)再生長組織中に少量のGFPしか示さなかったが、一方で広範囲なウイルス症状を示した。この結果は、前記ウイルス集団が、前記遺伝子挿入物を組換えにより失ったウイルスにより特徴づけられたことを示唆している。BSG1057を含む植物は、(第1世代及び第7世代継代の両方とも)再生長組織中への良好な全身性侵襲を示した。これは、BSG1037に比べてBSG1057における外来遺伝子挿入、つまりgfp遺伝子の優れた遺伝学的安定性を示唆している。

#### 【0057】

この外来遺伝子の遺伝学的安定性は、2つの補足的な遺伝子挿入物：ニワトリからのインターフェロン及びヒト・アルファ・ガラクトシダーゼAの使用においても見られた。BSG1037ウイルス調製物中の両方の遺伝子の一連の継代実験は、植物内でのむらのある産物の生産を示し、一方でBSG1057における類似の実験は、植物内でのより均一な産物の蓄積を示した。上記実験は、前記BSG1057がかなりの程度まで多数の継代にわたり外来遺伝子挿入物を保持することを示唆する。

#### 【0058】

本発明並びの本願発明の作製、使用のやり方と工程を、関連する当業者の前キ本願発明の対象物の作製及び使用を可能にするためにとても完全、明確、簡潔、かつ、正確に記載されている。本発明の先に記載の好ましい態様及び請求に宣言する本発明の範囲から逸脱することなくそこになされるであろう修正は理解される。発明として企図される主題を特に述べ、そして明確に請求するために上記クレームは本明細書を結論するものである。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1a】 図1は、BSG1057ベクター(配列番号4)に含まれる変更移動タンパク質とBSG1037ベクター(配列番号3)に含まれる野生型移動タンパク質をコードするヌクレオチド配列の比較を表す。配列の一致は、\*によって示され、そしてミスマッチは、-によって示す。

【図1b】 図1は、BSG1057ベクター(配列番号4)に含まれる変更移動タンパク質とBSG1037ベクター(配列番号3)に含まれる野生型移動タンパク質をコードするヌクレオチド配列の比較を表す。配列の一致は、\*によって示され、そしてミスマッチは、-によって示す。

【図2】 図2は、BSG1057ベクター(配列番号6)に含まれる変更移動タンパク質とBSG1037ベクター(配列番号5)に含まれる野生型移動タンパク質をコードするアミノ酸配列の比較を表す。配列の一致は、\*によって示され、そしてミスマッチは、-によって示す。

【図3】 図3は、BSG1037ベクターの制限部位の概念図である。

【図4】 図4は、BSG1057ベクターの制限部位の概念図である。

【図5a】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図5b】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図5c】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図5d】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図5e】 図5は、BSG1037(配列番号1)の完全配列である。

【図6a】 図6は、BSG1057(配列番号2)の完全配列である。

【図6b】 図6は、BSG1057(配列番号2)の完全配列である。

【図 6 c】 図6は、BSG1057（配列番号2）の完全配列である。

【図 6 d】 図6は、BSG1057（配列番号2）の完全配列である。

【図 6 e】 図6は、BSG1057（配列番号2）の完全配列である。

【図 7】 図7は、BSG1057中の変異の位置の概念地図である。

【図 8】 図8は、接種後20日目のN.ベンサミアナを示す。植物が5つずつ4列ある。一番左の列には、第1世代のBSG1037を接種した植物を示す。2列目は第7世代のBSG1037、3列目は第1世代のBSG1057、4列目は第7世代のBSG1057である。

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> LARGE SCALE BIOLOGY CORPORATION	10
<120> VIRAL EXPRESSION VECTORS	
<130> 008010165USPC01	
<150> 60/132,697	
<151> 1999-05-04	
<160> 6	
<170> FastSEQ for Windows Version 3.0	
<210> 1	
<211> 7685	20
<212> DNA	
<213> Nicotiana tabacum	
<400> 1	
gtattttttac aacaattacc aacaacaaca aacaacagac aacattacaa ttactatttta	60
caattacaat ggcatcacaca cagacagcta ccacatcagc tttgctggac actgtccgag	120
gaaacaactc cttgggtcaat gatctagcaa agcgtcgtct ttacgacaca gcggttgaag	180
agtttaacgc tcgtgaccgc aggcccaagg tgaacttttc aaaagtaata agcgaggagc	240
agacgcttat tgctaccccg gcgtatccag aattccaaat tacattttat aacacgcaaa	300
atgccgtgca ttcgcttgca ggtggattgc gatcctttaga actggaatat ctgatgatgc	360
aaattcccta cggatcattg acctatgaca taggcgggaa ttttgcacgc catctgttca	420
agggacgagc atatgtacac tgctgcatgc ccaacctgga cgttcgagac atcatgcggc	480
acgaaggcca gaaagacagt attgaactat acctttctag gctagagaga ggggggaaaa	540
cagtcccaa cttccaaaag gaagcatttg acagatacgc agaaattcct gaagacgctg	600
tctgtcacaa tactttccag acatgcgaac atcagccgat gcagcaatca ggcagagtgt	660
atgccattgc gctacacagc atatatgaca taccagccga tgagttcggg gcgcactct	720
tgaggaaaaa tgctcatagc tgctatgccg ctttccactt ctccgagaac ctgcttcttg	780
aagattcatg cgtcaatttg gacgaaatca acgcgtgttt ttccgcgcgat ggagacaagt	840
tgaccttttc ttttgcacga gagagtactc ttaattactg tcatagttat tctaattatc	900
ttaagtatgt gtgcaaaact tacttcccgg cctctaatag agagggttac atgaaggagt	960
tttttagtcac cagagttaat acctggtttt gtaagttttc tagaatagat acttttcttt	1020
tgtacaaaagg tgtggcccat aaaagtgtag atagttagca gttttatact gcaatggaag	1080
acgcattggca ttacaaaaag actcttgcaa tgtgcaacag cgagagaatc ctcttgagg	1140
attcatcatc agtcaattac tgggttccca aaatgaggga tatggctcatc gtaccattat	1200
tcgacatttc tttggagact agtaagagga cgcgcaagga agtcttagtg tccaaggatt	1260
tcgtgtttac agtgcttaac cacattcgaa cataccggc gaaagctctt acatacgcaa	1320
atgttttgtc cttcgtcgaa tcgattcgat cgagggtaat cattaacggt gtgacagcga	1380
ggtccgaatg ggatgtggac aaatccttgt tacaatcctt gtccatgacg ttttacctgc	1440
atactaagct tgccgttcta aaggatgact tactgattag caagtttagt ctcggttcga	1500
aaacgggtgtg ccagcatgtg tgggatgaga tttcgtggtc gtttggaac gcatttcct	1560
ccgtgaaaga gaggtccttg aacaggaaac ttatcagagt ggcaggcgac gcattagaga	1620
tcagggtgac tgatctatat gtgaccttc acgacagatt agtgactgag tacaaggcct	1680
ctgtggacat gcctgcgctt gacattagga agaagatgga agaaacggaa gtgatgtaca	1740
atgcactttc agaattatcg gtgttaaggg agtctgacaa attcgatgtt gatgtttttt	1800
cccagatgtg ccaatccttg gaagttgacc caatgacggc agcgaagggt atagtcgagg	1860
tcatgagcaa tgagagcggg ctgactctca catttgaaac acctactgag gcgaatgttg	1920
cgctagcttt acaggatcaa gagaaggctt cagaagggtc attggtagtt acctcaagag	1980
aagttgaaga accgtccatg aagggttcga tggccagagg agagttacaa ttagctggtc	2040

30

40

ttgctggaga	tcatccggaa	tcgtctctatt	ctaagaacga	ggagatagag	tcttttagagc	2100
agtttcatat	ggcgacggca	gattcgttaa	tccgtaagca	gatgagctcg	atttgtgtaca	2160
cgggtccgat	taaagtccag	caaatgaaaa	actttatcga	tagcctggta	gcatactat	2220
ctgctgcggt	gtcgaatctc	gtcaagatcc	tcaaagatac	agctgctatt	gaccttgaaa	2280
cccgctcaaaa	gtttggagtc	ttggatgttg	catctaggaa	gtggtaaatc	aaaccaacgg	2340
caaagagtca	tgcattgggt	gtttgtgaaa	cccacgcgag	gaagtatcat	gtggcgcttt	2400
tggaatatga	tgagcagggt	gtggtgacat	gcgatgattg	gagaagagta	gctgttagct	2460
ctgagtcctgt	tgtttatcc	gacatggcga	aactcagaac	tctgcgcaga	ctgcttcgaa	2520
acggagaacc	gcatgtcagt	agcgcgaagg	ttgttcttgt	ggacggagtt	ccgggctgtg	2580
gaaaaaccaa	agaaattctt	tccagggtta	attttgatga	agatctaatt	ttagtacctg	2640
ggaagcaagc	cgcggaatg	atcagaagac	gtgcgaattc	ctcagggtt	atttgtggcca	2700
cgaaggacaa	cgttaaaacc	gttgattctt	tcattgatga	ttttgggaaa	agcacacgct	2760
gtcagttcaa	gaggttattc	attgatgaag	gggtgatgtt	gcatactggg	tgtgttaatt	2820
ttcttgtggc	gatgtcattg	tgcgaaattg	catatgttta	cggagacaca	cagcagattc	2880
catacatcaa	tagagtttca	ggattcccgt	accccgccta	ttttgccaaa	ttggaagttg	2940
acgaggtgga	gacacgcaga	actactctcc	gttggtccagc	cgatgtcaca	cattatctga	3000
acaggagata	tgagggtttt	gtcatgagca	cttcttcggt	taaaaagtct	gtttcgagg	3060
agatgggtcgg	cggagccgccc	gtgatcaatc	cgatctcaaa	acccttgcat	ggcaagatct	3120
tgacttttac	ccaatcggat	aaagaagctc	tgctttcaag	agggatttca	gatgttcaca	3180
ctgtgcatga	agtgcaaggc	gagacatact	ctgatgtttc	actagttagg	ttaaccctta	3240
caccggtctc	catcattgca	ggagacagcc	cacatgtttt	ggtcgcattg	tcaaggcaca	3300
cctgttcgct	caagtactac	actgttggtt	tggatccttt	agttagatc	attagagatc	3360
tagagaaact	tagctcgtac	ttgttagata	tgtataaggt	cgatgcagga	acacaatagc	3420
aattacagat	tgactcggtg	ttcaaagggt	ccaatctttt	tgttgccagc	ccaaagactg	3480
tgatatattt	tgatatgcag	ttttactatg	ataagtgtct	cccaggcaac	agcaccatga	3540
tgaataattt	tgatgctgtt	accatgaggt	tgactgacat	ttcattgaat	gtcaaagatt	3600
gcataattgga	tatgtctaa	tctgttgctg	gcctaagga	tcaaatcaaa	ccactaatat	3660
ctatggtacg	aacggcggca	gaaatgccac	gccagactgg	actattggaa	aatttagtgg	3720
cgatgattaa	aagaaacttt	aacgcacccg	agttgtctgg	catcattgat	attgaaaata	3780
ctgcatcttt	gggtgtagat	aagttttttg	atagttattt	gcttaaagaa	aaaagaaaac	3840
caataaaaaa	tgtttctttg	ttcagtagag	agtctctcaa	tagatgggta	gaaaagcagg	3900
aacaggtaac	aataggccag	ctcgcagatt	ttgattttgt	ggatttgcca	gcagttgatc	3960
agtacagaca	catgattaaa	gcacaaccca	aacaaaagtt	ggacacttca	atccaaacgg	4020
agtaccgggc	tttgacagac	atttgtgtacc	attcaaaaaa	gatcaatgca	atattcggcc	4080
cgttgtttag	tgagcttact	aggcaattac	tggacagtgt	tgattcagac	agatttttgt	4140
ttttcacaa	aaagacacca	gcgcagattg	aggatttctt	cggagatctc	gacagtcatt	4200
tgccgatgga	tgtcttgagg	ctggatatat	caaaatacga	caaatctcag	aatgaattcc	4260
actgtgcagt	agaatacag	atctggcgaa	gattgggttt	cgaagacttc	ttggggagaag	4320
tttggaacaa	agggcataga	aagaccaccc	tcaaggatta	taccgcagggt	ataaaaactt	4380
gcactctggt	tcaaagaaa	agcggggacg	tcacgacgtt	cattggaaa	actgtgatca	4440
ttgctgcatg	tttggcctcg	atgcttccga	tggagaaaat	aatcaaagga	gccttttgcc	4500
gtgacgatag	tctgctgtac	tttccaaagg	gttgtgagtt	tccggatgtg	caacactccg	4560
cgaatcttat	gtggaatttt	gaagcaaaac	tgtttaaaaa	acagtatgga	tacttttgcc	4620
gaagatatgt	aatacatcac	gacagaggat	gcatttgtta	ttacgatccc	ctaaagttag	4680
tctcgaaaact	tggtgctaaa	cacatcaagg	attgggaaca	cttggaggag	ttcagaaggt	4740
ctctttgtga	tggtgctggt	tcgttgaaca	attgtgcgta	ttacacacag	ttggacgacg	4800
ctgtatggga	ggttcataag	accgcccctc	cagggttcgtt	tgtttataaa	agtcctggtga	4860
agtatttgtc	tgataaaagt	cttttttagaa	gtttgtttat	agatggctct	agttgttaaa	4920
ggaaaagtga	atatcaatga	gtttatcgac	ctgacaaaaa	tggagaagat	cttaccgtcg	4980
atgtttacc	ctgtaaagag	tgttatgtgt	tccaaagttg	ataaaataat	ggttcatgag	5040
aatgagtcac	tgtcaggggg	gaaccttctt	aaaggagtta	agcttattga	tagtggatag	5100
gtctgtttag	cgggtttggt	cgtcacgggc	gagtggaact	tgctgacaa	ttgcagagga	5160
ggtgtgagcg	tgtgtctggt	ggacaaaagg	atggaaaag	cgcacgaggg	cactctcgga	5220
tcttactaca	cagcagctgc	aaagaaaaga	tttcagttca	aggtcggttc	caattatgct	5280
ataaccaccc	aggacgcgat	gaaaaacgtc	tggcaagttt	tagttaatat	tagaaatgtg	5340
aagatgtcag	cgggtttctg	tccgctttct	ctggagtttg	tgtcgggtgt	tattgtttat	5400
agaaataata	taaaattagg	tttgagagag	aagattacaa	acgtgagaga	cggagggccc	5460

10

20

30

```

atggaactta cagaagaagt cgttgatgag ttcattggaag atgtccctat gtcgatcagg 5520
cttgcaaaagt ttcgatctcg aaccggaaaa aagagtgatg tccgcaaagg gaaaaatagt 5580
agttagtgatc ggtcagtgcc gaacaagaac tatagaaatg ttaaggattt tggagggaatg 5640
agtttttaaaa agaataattt aattcgatgat gattcggagg ctactgtcgc cgaatcggat 5700
tcgttttaaaa tagatcttac agtalcacta ctccatctca gttcgtgttc ttgtcattaa 5760
ttaaatggct agcaaaaggag aagaactttt cactggagtt gtcccaattc ttgttgaatt 5820
agatgggtgat gttaatgggc acaaattttc tgtcagtgga gaggggtgaag gtgatgctac 5880
atcaggaaaag cttaccctta aatttatattg cactactgga aaactacctg ttccatggcc 5940
aacacttgct actactttct cttatgggtg tcaatgcttt tcccgttatc cggatcatat 6000
gaaacggcat gactttttca agagtgccat gcccgaagg tttgtacagg aacgcactat 6060
atctttcaaa gatgacggga actacaagac gcgtgctgaa gtcaagtttg aaggtgatac 6120
ccttggttaat cgtatcgagt taaaaggatg tgattttaaa gaagatggaa acattctcgg 6180
acacaaactc gagtacaact ataactcaca caatgtatac atcacggcag acaaacaaaa 6240
gaatggaatc aaagctaact tcaaaattcg ccacaacatt gaagatggat ccgttcaact 6300
agcagaccat tatcaacaaa atactccaat tggcgatggc cctgtccttt taccagacaa 6360
ccattacctg tcgacacaaat ctgccctttc gaaagatccc aacgaaaagc gtgaccacat 6420
ggcgcttctt gaggtttgtaa ctgctgctgg gattacacat ggcatggatg agctctacaa 6480
ataatgacac tcgaggggta gtcaagatgc ataataaata acggattgtg tccgtaatac 6540
cacgtgggtgc gtacgataac gcatagtgtt ttccctcca cttaaatcga agggtttgtg 6600
cttggatcgc gcgggtcaaa tgtatatggt tcatatacat ccgcaggcac gtaataaagg 6660
gaggggttcg ggtcagggtc ggctgtgaaa ctogaaaagg ttccggaaaa caaaaaagag 6720
agtggtaggt aatatgttta ataataagaa aataaataat agtggtaaga aaggtttgaa 6780
agttgaggaa attgaggata atgtaagtga tgacgagtc atcgcgtcat cgagtacgtt 6840
ttaatcaata tgccttatac aatcaactct ccgagccaat ttgtttactt aagttccgct 6900
tatgcagatc ctgtgcagct gatcaactct tgtacaaatg cattgggtta ccagtttcaa 6960
acgcaacaac ctaggacaac agtccaacag caatttgagg atgcctggaa acctgtgctt 7020
agtatgcagc tgagatttcc tgcacgggat ttctatgtgt atagatataa ttcgacgctt 7080
gatccgttga tcacggcggt attaaatagc ttcgatacta gaaatagaat aatagagggt 7140
gataatcaac ccgcaccgaa tactactgaa atcggttaac cgactcagag ggtagacgat 7200
gcgactgtga ctataagggc ttcaatcaat aatttggtga atgaactggt tcgtggaact 7260
ggcatgttca atcaagcaag ctttgagact gctagtggac ttgtctggac cacaactccg 7320
gctacttagc tattgttgtg agatttccca aaataaagtc actgaagact taaaattcag 7380
gggtggctgat accaaaatca gcagtggttg ttcgctccact taaatataac gattgtcata 7440
tctggatcca acagttaaac catgtgatgg tgtatactgt ggtatggcgt aaaacaacgg 7500
aaaagtcgct gaagacttaa aattcagggt ggctgatacc aaaatcagca gtggttgttc 7560
gtccacttaa aaataacgat tgtcatatct ggatccaaca gttaaaccat gtgatgggtg 7620
atactgtggt atggcgtaaa caacggagag gttcgaatcc tcccctaacc gcgggtagcg 7680
gcca 7685

```

10

<210> 2  
 <211> 7686  
 <212> DNA  
 <213> Nicotiana tabacum

20

```

<400> 2
gtatttttac aacaattacc aacaacaaca aacaacagac aacattacaa ttactattta 60
caattacaat ggcatacaca cagacagcta ccacatcagc ttgctggac actgtccgag 120
gaaacaactc cttggtcaat gatctagcaa agcgtcgtct ttacgacaca gcggttgaag 180
agtttaacgc tcgtgaccgc aggcccaagg tgaacttttc aaaagtaata agcaggagac 240
agacgcttat tgctaccccg gcgtatccag aattccaaat tacattttat aacacgcaaa 300
atgccgtgca ttcgcttgca ggtggattgc gatctttaga actggaatat ctgatgatgc 360
aaattcccta cggatcattg acttatgaca taggcgggaa ttttgcacgc catctgttca 420
agggacgagc atatgtacac tgctgcatgc ccaacctgga cgttcgagac atcatgcggc 480
acgaaggcca gaaagacagt attgaactat acctttctag gctagagaga ggggggaaaa 540
cagtccccaa cttccaaaag gaagcatttg acagatacgc agaaattcct gaagacgctg 600

```

30

tctgtcacaa	tactttccag	acatgcgaac	atcagccgat	gcagcaatca	ggcagagtgt	660
atgccattgc	gctacacagc	atatatgaca	taccagccga	tgagtccggg	gcggcactct	720
tgaggaaaaa	tgcccatatc	tgctatgccg	ctttccactt	ctccgagaac	ctgcttcttg	780
aagattcatg	cgtcaatttg	gacgaaatca	acgcgtgttt	ttcgcgcgat	ggagacaagt	840
tgaccttttc	ttttgcatca	gagagtactc	tttaattactg	tcatagttag	tctaataatc	900
ttaagtatgt	gtgcaaaact	tacttcccgg	cctctaataag	agagggtttac	atgaaggagt	960
tttttagtcac	cagagttaat	acctgggtttt	gtaagttttc	tagaatagat	acttttcttt	1020
tgtacaaaagg	tgtggcccat	aaaagtgtag	atagttagca	gttttatact	gcaatggaag	1080
acgcatggca	ttacaaaaag	actcttgcaa	tgtgcaacag	cgagagaatc	ctccttgggg	1140
attcatcatc	agtcaattac	tggtttccca	aaatgaggga	tatggctatc	gtaccattat	1200
tgcacatttc	tttgagagact	agtaagagga	cgcgcgaagg	agtcttagtg	tccaaggatt	1260
tctgtttcac	agtgtctaac	cacattcgaa	cataccaggc	gaaagctctt	acatacgcaa	1320
atgtttttgtc	cttcgtcgaa	tgcattcgat	cgagggtaat	cattaacggt	gtgacagcga	1380
ggctccgaatg	ggatgtggac	aaatctttgt	tacaatcctt	gtccatgacg	ttttacctgc	1440
atactaagct	tgccgttcta	aaggatgact	tactgattag	caagtttagt	ctcgttccga	1500
aaacgggtgtg	ccagcatgtg	tgggatgaga	tttcgctggc	gtttgggaac	gcatttccct	1560
ccgtgaaaga	gaggctcttg	aacaggaaac	ttatcagagt	ggcaggcgag	gcattagaga	1620
tacgggtgcc	tgatctatat	gtgaccttcc	acgacagatt	agtactgag	tacaaggcct	1680
ctgtggacat	gcctgcgctt	gacattagga	agaagatgga	agaaacggaa	gtgatgtaca	1740
atgcactttc	agaattatcg	gtgttaagg	agtctgacaa	attcgatgtt	gatgtttttt	1800
cccagatgtg	ccaatctttg	gaagttgacc	caatgacggc	agcgaagggt	atagtcgagg	1860
tcatgagcaa	tgagagcggg	ctgactctca	catttgaacg	acctactgag	gcgaatgttg	1920
cgctagcttt	acaggatcaa	gagaaggctt	cagaagggtc	attggtagtt	acctcaagag	1980
aagttgaaga	accgtccatg	aagggttcga	tgccagagg	agagttacaa	ttagctgggtc	2040
ttgtctggaga	tcatccggaa	tctgtctatt	ctaagaacga	ggagatagag	tcttttagagc	2100
agtttcatat	ggcgacggca	gattcgttaa	ttcgtaaagc	gatgagctcg	attgtgtaca	2160
cgggtccgat	taaagtccag	caaatgaaaa	actttatcga	tagcctggta	gcatactat	2220
ctgctgagg	gtcgaatctc	gtcaagatcc	tcaaagatac	agctgctatt	gaccttgaaa	2280
cccgtaaaaa	gtttggagtc	ttggatgttg	catctaggaa	gtggttaatc	aaaccaacgg	2340
ccaagagtca	tgcattgggt	gttgttgaaa	cccacgcgag	ggagtatcat	gtggcgcttt	2400
tggaatatga	tgagcagggt	gtggtgacat	gcgatgattg	gagaagagta	gctgttagct	2460
ctgagtcgtg	gttttatctc	gacatggcga	aactcagaac	tctgcgcaga	ctgcttcgaa	2520
acgggagaacc	gcatgtcagt	agcgcgaagg	ttgttcttgt	ggacggaggt	ccgggctgtg	2580
gaaaaaccaa	agaaatctct	tccagggtta	attttgatga	agatctaatt	ttagtacctg	2640
ggaagcaagc	cgcggaaatg	atcagaagac	gtgcgaattc	ctcagggatt	attgtggcca	2700
cgaaggacaa	cgttaaaaacc	gttgattctt	tcatgtgaa	ttttgggaaa	agcacacgct	2760
gtcagttcaa	gagggttatc	attgatgaag	gggtgatgtt	gcatactggg	tgtgttaatt	2820
ttcttgtggc	gatgtcattg	tgcgaaattg	catatgttta	cggagacaca	cagcagattc	2880
catacatcaa	tagagtttca	ggattcccgt	accccgccca	ttttgccaaa	ttggaagttg	2940
acgaggtgga	gacacgcaga	actactctcc	gttgctccagc	cgatgtcaca	cattatctga	3000
acaggagata	tgagggtttt	gtcatgagca	cttcttcggt	taaaaagtct	gtttcgcagg	3060
agatgggtcgg	cggagccgcc	gtgatcaatc	cgatctcaaa	accttgcgat	ggcaagatcc	3120
tgactttttac	ccaatcggat	aaagaagctc	tgctttcaag	agggtattca	gatgttcaca	3180
ctgtgcatga	agtgcaggcc	gagacatact	ctgatgtttc	actagttagg	ttaaccccta	3240
caccgggtctc	catcattgca	ggagacagcc	cacatgtttt	ggtcgcattg	tcaaggcaca	3300
cctgttcgct	caagtactac	actggttgta	tggatccttt	agttagtagc	attagagatc	3360
tagagaaact	tagctcgtac	ttgttagata	tgtataaggt	cgatgcagga	acacaatagc	3420
aattacagat	tgactcgggt	ttcaaagggt	ccaatctttt	tggtgcagcg	ccaaagactg	3480
gtgatatttc	tgatatgcag	ttttactatg	ataagtgctc	cccaggcaac	agcaccatga	3540
tgaataaattt	tgatgctgtt	accatgaggt	tgactgacat	ttcatggaat	gtcaaagatt	3600
gcatattgga	tatgtctaag	tctgttgctg	cacctaaagga	tcaaatcaaa	ccactaatac	3660
ctatggtacg	aacggcggca	gaaatgccac	gccagactgg	actattggaa	aatttagtgg	3720
cgatgattaa	aagaaacttt	aacgcacccg	agttgtctgg	catcattgat	attgaaaata	3780
ctgcactctt	ggttgttagat	aagttttttg	atagttattt	gcttaaagaa	aaaagaaaac	3840
caataaaaaa	tgtttctttg	ttcagtagag	agtcctctca	tagatgggtta	gaaaagcagg	3900
aacaggtaac	aataggccag	ctcgcagatt	ttgattttgt	ggatttgcca	gcagttgatc	3960
agtacagaca	catgattaaa	gcacaaccca	aacaaaagtt	ggacacttca	atccaaacgg	4020

10

20

30



agtacccggc	tttgcagacg	atttgtgtacc	attcaaaaaa	gatcaatgca	atattcggcc	4080
cgttgttttag	tgagcttact	aggcaattac	tgacagctgt	tgattcgcgc	agatttttgt	4140
ttttcacaaag	aaagacacca	gcgcagattg	aggattttctt	cggagatctc	gacagtcattg	4200
tgccgatgga	tgctctggag	ctggatatat	caaaatacga	caaatactcag	aatgaattcc	4260
actgtgcagt	agaatacgcg	atctggcgaa	gattgggttt	cgaagacttc	ttgggagaag	4320
tttggaaca	agggcataga	aagaccaccc	tcaaggatta	taccgcaggt	ataaaaaactt	4380
gcacctggta	tcaaagaaaag	agcggggacg	tcacgcaggt	cattggaaac	actgtgatca	4440
ttgctgcattg	tttggcctcg	atgcttccga	tgagagaaaat	aatcaaaagg	gccttttgcg	4500
gtgacgatag	tctgctgtac	tttccaaagg	gttgtgagtt	tccggatgtg	caacactccg	4560
cgaatcttatt	gtggaattttt	gaagcaaaac	tgtttaaaaa	acagtatgga	tacttttgcg	4620
gaagatatgt	aatacatcac	gacagaggat	gcattgtgtg	ttacgatccc	ctaaagtga	4680
tctcgaaact	tggtgctaaa	cacatcaagg	attgggaaca	cttggaggag	ttcagaaggt	4740
ctcttttgtga	tggtgctgtt	tctgtgaaca	attgtgcgta	ttacacacag	ttggacgacg	4800
ctgtatggga	gggtcataag	accgcccctc	cagggttcgtt	tgtttataaa	agtctggtga	4860
agtattttgtc	tgataaagtt	cttttttagaa	gtttgtttat	agatggctct	agtgtgttaa	4920
ggaaaagtga	atatcaatga	gtttatcgac	ctgacaaaaa	tgagagaagt	cttaccgtcg	4980
atgttttacc	ctgtaaaagag	tgttatgtgt	tccaaagtgt	ataaaataat	ggttcatgag	5040
aatgagtcatt	tgctcaggggt	gaaccttctt	aaaggagtta	agcttattga	tgttggtatc	5100
gtctgttttag	ccggttttgt	cgtcacgggc	gagtggaact	tgcttgacaa	ttgcagagga	5160
gggtgtgagcg	tggtgtctgg	ggacaaaagg	atggaaaagag	ccgacgaggc	cattctcgga	5220
cttactactca	cagcagctgc	aaagaaaaga	tttcagttca	aggtcgttcc	caattatgct	5280
ataaccaccc	aggacgcgct	gagaaacgtc	tggaacgttt	tagttaatat	tagaaatgtg	5340
aagatgtcag	cgggtttctg	tccgctttct	ctggagtttg	tgctgggtgt	tattgtttat	5400
agaaataata	taaaattagg	tttgagagag	aagattacaa	acgtgagaga	cggaggggcc	5460
attggaactta	cagaagaagt	cgttgatgag	ttcatgggaag	atgtcccctat	gtcgatcagg	5520
cttgcaaatga	ttcgactctg	aaccggaaaa	aagagtgtatg	tccgcaaaag	gaaaaatagt	5580
agtagtgtac	ggctcagtgc	gaacaagaac	tatagaaatg	ttaaggattt	tgagggaatg	5640
agtttttaaaa	agaataattt	aatcgatgat	gattcggagg	ctactgtcgc	cgaatcggat	5700
tctgttttaaa	tagatctttac	agtatcacta	ctccatctca	gttcgtgttc	ttgtcattaa	5760
ttaaatggct	agcaaaaggag	aagaactttt	cactggagtt	gtcccaattc	ttgttgattt	5820
agatgggtgat	gttaaatgggc	acaaattttc	tgctcagtga	gaggggtgaa	gtgatgctac	5880
atacggaaag	cttacactta	aattttattg	cactactgga	aaactacctg	ttccatggcc	5940
aacactttgtc	actactttct	cttatggtgt	tcaatgcttt	tcccgttatc	cggatcatat	6000
gaaacggcat	gactttttca	agagtgtccat	gcccgaagg	tatgtacagg	aacgcactat	6060
atcttttcaaa	gatgcaggga	actacaagac	gcgtgctgaa	gtcaagtttg	aaggtgatac	6120
ccttgttaat	cgtatcgagt	taaaagggtat	tgatttttaaa	gaagatggaa	acattctcgg	6180
acacaaactc	gagtacaact	ataactcaca	caatgtatac	atcacggcag	acaaacaaaa	6240
gaatgggaatc	aaagctaact	tcaaaattcg	ccacaacatt	gaagatggat	ccgttcaact	6300
agcagaccat	tatcaacaaa	atactccaat	tgccgatggc	cctgtccttt	taccagacaa	6360
ccattacctg	tcgacacaa	ctgccctttc	gaaagatccc	aacgaaaagc	gtgaccacat	6420
ggctccttctt	gagtttgtta	ctgctgctgg	gattacacat	ggcatggatg	agctctacaa	6480
ataatgacac	tcgaggggta	gtcaagatgc	ataataaata	acggattgtg	tccgtaatca	6540
cacgtgggtgc	gtacgataac	gcatagtgtt	tttccctcca	cttaaatcga	agggttgtgt	6600
cttggatcgc	gcgggtcaaa	tgtatatggt	tcatatacat	cgcagggcac	gtaataaagc	6660
gaggggttcg	ggctcaggtc	ggctgtgaaa	ctcgaaaagg	ttccggaaaa	caaaaaagag	6720
agtggtaggt	aatagtgtta	ataataagaa	aataaataat	agtggtaaga	aaggtttgaa	6780
agttgaggaa	attgaggata	atgtaagtga	tgacgagctc	atcgcgctcat	cagtagcgtt	6840
ttaatcaata	tgctttatc	aatcaactct	ccgagccaat	ttgtttactt	aagttccgct	6900
tatgcagatc	ctgtgcagct	gatcaatctg	tgtacaaaatg	cattgggttaa	ccagtttcaa	6960
acgcaacaag	ctaggacaac	agtccaacag	caatttgccg	atgcctggaa	acctgtgcct	7020
agtatgacag	tgagatttcc	tgcatcggat	ttctatgtgt	atagatataa	ttcgacgctt	7080
gatccgttga	tcacggcggt	attaaatagc	ttcgatacta	gaaatagaat	aatagagggt	7140
gataatcaac	ccgcaccgaa	tactactgaa	atcggttaacg	cgactcagag	ggtagacgat	7200
gcgactgtag	ctataagggc	ttcaatcaat	aatttggtta	atgaactggg	tcgtggaaact	7260
ggcatgttca	atcaagcaag	ctttgagact	gctagtggac	ttgtctggac	cacaactccg	7320
gctacttagc	tattgttgtg	agatttccta	aaataaagtc	actgaagact	taaaaattcag	7380
gggtgctgat	acccaaatca	gcagtgggtg	ttcgtccact	taaatataac	gattgtcata	7440

10

20

30

tctggatcca	acagttaaac	catgtgatgg	tgtatactgt	ggtatggcgt	aaaacaacgg	7500
aaaagtcgct	gaagacttaa	aattcagggg	ggctgatacc	aaaatcagca	gtgggtgttc	7560
gtccacttaa	aaataacgat	tgtcatatct	ggatccaaca	gttaaaccat	gtgatgggtg	7620
atactgtggt	atggcgtaaa	acaacggaga	ggttcgaatc	ctccccaac	cgcgggtagc	7680
ggccca						7686

<210> 3  
 <211> 857  
 <212> DNA  
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 3						
atggctctag	ttgttaaagg	aaaagtgaat	atcaatgagt	ttatcgacct	gacaaaaatg	60
gagaagatct	taccgtcgat	gtttaccctt	gtaaagagtg	ttatgtgttc	caaagttagt	120
aaaataatgg	ttcatgagaa	tgagtcattg	tcaggggtga	accttcttaa	aggagttaaag	180
cttattgata	gtggatacgt	ctgtttagcc	ggtttggctg	tcacgggcga	gtggaacttg	240
cctgacaatt	gcagaggagg	tgtgagcgtg	tgtctgggtg	acaaaaggat	ggaaagagcc	300
gacgaggcca	ctctcggatc	ttactacaca	gcagctgcaa	agaaaagatt	tcagttcaag	360
gtcgttccca	attatgctat	aaccaccag	gacgcgatga	aaaacgtctg	gcaagtttta	420
gttaatatata	gaaatgtgaa	gatgtcagcg	aaaacgtctg	gcaagtttta	gttaatatata	480
gaaatgtgaa	gatgtcagcg	ggtttctgtc	cgctttctct	ggagtgtgtg	tcggtgtgta	540
ttgtttatag	aaataatata	aaattaggtt	tgagagagaa	gattacaaac	gtgagagacg	600
gagggcccat	ggaacttaca	gaagaagtcg	ttgatgagtt	catggaagat	gtccctatgt	660
cgatcaggct	tgcaaagttt	cgatctcgaa	ccggaaaaaa	gagtgatgtc	cgcaaaggga	720
aaaatagtag	tagtgatcgg	tcagtgcgga	acaagaacta	tagaaatggt	aaggattttg	780
gaggaatgag	ttttaaaaag	aataatttaa	tcgatgatga	ttcggaggct	actgtcgccg	840
aatcggattc	gttttaa					857

<210> 4  
 <211> 807  
 <212> DNA  
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 4						
atggctctag	ttgttaaagg	aaaagtgaat	atcaatgagt	ttatcgacct	gacaaaaatg	60
gagaagatct	taccgtcgat	gtttaccctt	gtaaagagtg	ttatgtgttc	caaagttagt	120
aaaataatgg	ttcatgagaa	tgagtcattg	tcaggggtga	accttcttaa	aggagttaaag	180
cttattgata	gtggatacgt	ctgtttagcc	ggtttggctg	tcacgggcga	gtggaacttg	240
cctgacaatt	gcagaggagg	tgtgagcgtg	tgtctgggtg	acaaaaggat	ggaaagagcc	300
gacgaggcca	ttctcggatc	ttactacaca	gcagctgcaa	agaaaagatt	tcagttcaag	360
gtcgttccca	attatgctat	aaccaccag	gacgcgatga	gaaacgtctg	gcaagtttta	420
gttaatatata	gaaatgtgaa	gatgtcagcg	ggtttctgtc	cgctttctct	ggagtgtgtg	480
tcggtgtgta	ttgtttatag	aaataatata	aaattaggtt	tgagagagaa	gattacaaac	540
gtgagagacg	gagggcccat	ggaacttaca	gaagaagtcg	ttgatgagtt	catggaagat	600
gtccctatgt	cgatcaggct	tgcaaagttt	cgatctcgaa	ccggaaaaaa	gagtgatgtc	660
cgcaaaggga	aaaatagtag	tagtgatcgg	tcagtgcgga	acaagaacta	tagaaatggt	720
aaggattttg	gaggaatgag	ttttaaaaag	aataatttaa	tcgatgatga	ttcggaggct	780
actgtcgccg	aatcggattc	gttttaa				807

<210> 5  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 5

10

20

30

```

Met Ala Leu Val Val Lys Gly Lys Val Asn Ile Asn Glu Phe Ile Asp
 1      5      10      15
Leu Thr Lys Met Glu Lys Ile Leu Pro Ser Met Phe Thr Pro Val Lys
 20      25      30
Ser Val Met Cys Ser Lys Val Lys Ile Met Val His Glu Asn Glu Ser
 35      40      45
Leu Ser Gly Val Asn Leu Leu Lys Gly Val Lys Leu Ile Asp Ser Gly
 50      55      60
Tyr Val Cys Leu Ala Gly Leu Val Val Thr Gly Glu Trp Asn Leu Pro
 65      70      75      80
Asp Asn Cys Arg Gly Gly Val Ser Val Cys Leu Val Asp Lys Arg Met
 85      90      95
Glu Arg Ala Asp Glu Ala Thr Leu Gly Ser Tyr Tyr Thr Ala Ala Ala
 100      105      110
Lys Lys Arg Phe Gln Phe Lys Val Val Pro Asn Tyr Ala Ile Thr Thr
 115      120      125
Gln Asp Ala Met Lys Asn Val Trp Gln Val Leu Val Asn Ile Arg Asn
 130      135      140
Val Lys Met Ser Ala Gly Phe Cys Pro Leu Ser Leu Glu Phe Val Ser
 145      150      155      160
Val Cys Ile Val Tyr Arg Asn Asn Ile Lys Leu Gly Leu Arg Glu Lys
 165      170      175
Ile Thr Asn Val Arg Asp Gly Gly Pro Met Glu Leu Thr Glu Glu Val
 180      185      190
Val Asp Glu Phe Met Glu Asp Val Pro Met Ser Ile Arg Leu Ala Lys
 195      200      205
Phe Arg Ser Arg Thr Gly Lys Lys Ser Asp Val Arg Lys Gly Lys Asn
 210      215      220
Ser Ser Ser Asp Arg Ser Val Pro Asn Lys Asn Tyr Arg Asn Val Lys
 225      230      235      240
Asp Phe Gly Gly Met Ser Phe Lys Lys Asn Asn Leu Ile Asp Asp Asp
 245      250      255
Ser Glu Ala Thr Val Ala Glu Ser Asp Ser Phe
 260      265

```

```

<210> 6
<211> 268
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

```

```

<400> 6
Met Ala Leu Val Val Lys Gly Lys Val Asn Ile Asn Glu Phe Ile Asp
 1      5      10      15
Leu Thr Lys Met Glu Lys Ile Leu Pro Ser Met Glu Thr Pro Val Lys
 20      25      30
Ser Val Met Cys Ser Lys Val Asp Lys Ile Met Val His Glu Asn Glu
 35      40      45
Ser Leu Ser Gly Val Asn Leu Leu Lys Gly Val Lys Leu Ile Asp Ser
 50      55      60
Gly Tyr Val Cys Leu Ala Gly Leu Val Val Thr Gly Glu Trp Asn Leu
 65      70      75      80
Pro Asp Asn Cys Arg Gly Gly Val Ser Val Cys Leu Val Asp Lys Arg
 85      90      95
Met Glu Arg Ala Asp Glu Ala Thr Leu Gly Ser Tyr Tyr Thr Ala Ala
 100      105      110
Ala Lys Lys Arg Phe Gln Phe Lys Val Val Pro Asn Tyr Ala Ile Thr
 115      120      125
Thr Gln Asp Ala Met Lys Asn Val Trp Gln Val Leu Val Asn Ile Arg
 130      135      140
Asn Val Lys Met Ser Ala Gly Phe Cys Pro Leu Ser Leu Glu Phe Val
 145      150      155      160
Ser Val Cys Ile Val Tyr Arg Asn Asn Ile Lys Leu Gly Leu Arg Glu
 165      170      175
Lys Ile Thr Asn Val Arg Asp Gly Gly Pro Met Glu Leu Thr Glu Glu
 180      185      190
Val Val Asp Glu Phe Met Glu Asp Val Pro Met Ser Ile Arg Leu Ala
 195      200      205
Lys Phe Arg Ser Arg Thr Gly Lys Lys Ser Asp Val Arg Lys Gly Lys
 210      215      220
Asn Ser Ser Ser Asp Arg Ser Val Pro Asn Lys Asn Tyr Arg Asn Val
 225      230      235      240
Lys Asp Phe Gly Gly Met Ser Phe Lys Lys Asn Asn Leu Ile Asp Asp
 245      250      255
Asp Ser Glu Ala Thr Val Ala Glu Ser Asp Ser Phe
 260      265

```

10

20

30

40

## 【図 1 a】

30kDa運動タンパク質コード領域 (nts4903~5709) での BSG1037 (配列番号 3) と BSG1057 (配列番号 4) の配列の比較。不一致は、\_によって示され、そして配列の一致は、\*によって示される。

```

1037      ATGGCTCTAGTTGTTAAAGGAAAGTGAATCAATGAGTTTATCGACCT
1057      ATGGCTCTAGTTGTTAAAGGAAAGTGAATCAATGAGTTTATCGACCT
*****
1037      GACAAAATGGAGAAGATCTTACCGTCGATGTTTACCCCTGTAAAGAGTG
1057      GACAAAATGGAGAAGATCTTACCGTCGATGTTTACCCCTGTAAAGAGTG
*****
1037      TTATGTGTTCCAAAGTTGATAAAATAATGGTTCATGAGATGAGTCATTG
1057      TTATGTGTTCCAAAGTTGATAAAATAATGGTTCATGAGATGAGTCATTG
*****
1037      TCAGGGGTGAACCTTCTTAAAGAGTTAAGCTTATGATAGTGGATACGT
1057      TCAGGGGTGAACCTTCTTAAAGAGTTAAGCTTATGATAGTGGATACGT
*****
1037      CTGTTTAGCCGCTTTGGTCTGACGGGAGTGGAACCTTGCTGACAAIT
1057      CTGTTTAGCCGCTTTGGTCTGACGGGAGTGGAACCTTGCTGACAAIT
*****
1037      GCAGAGGAGGTGTGAGCGTGTCTGCTGGGACAAAGGATGAAAGAGCC
1057      GCAGAGGAGGTGTGAGCGTGTCTGCTGGGACAAAGGATGAAAGAGCC
*****
1037      GACAGGGCACTCTCGGATCTTACTACAGCAGCTGCAAGAAAAGATT
1057      GACAGGGCACTCTCGGATCTTACTACAGCAGCTGCAAGAAAAGATT
*****
1037      TCAGTTCAAGCTCGTCCCAATTATGCTAATCCACCCAGGAGCGATGA
1057      TCAGTTCAAGCTCGTCCCAATTATGCTAATCCACCCAGGAGCGATGA
*****
1037      AAAACGCTGGCAAGTTTGTATTAATTAGAAATGTGAGATGTCAGCG
1057      AAAACGCTGGCAAGTTTGTATTAATTAGAAATGTGAGATGTCAGCG
*****
1037      GGTTCCTGCTCCGCTTCTCTGGAGTTTGTGCGGTGTGATTGTTATAG
1057      GGTTCCTGCTCCGCTTCTCTGGAGTTTGTGCGGTGTGATTGTTATAG
*****
1037      AAATAATATAAATAGGTTTGAGAGAGAGATTACAACGTCGAGAGCG
1057      AAATAATATAAATAGGTTTGAGAGAGAGATTACAACGTCGAGAGCG
*****
1037      GAGGGCCCATGGAACCTTACAGAGAGAGTCTGATGAGTTCATGGAAGAT
1057      GAGGGCCCATGGAACCTTACAGAGAGAGTCTGATGAGTTCATGGAAGAT
*****
1037      GTCCCTATGTCGATCAGGCTTGCAAGTTTCGATCTCGAACCGGAAAAA
1057      GTCCCTATGTCGATCAGGCTTGCAAGTTTCGATCTCGAACCGGAAAAA
*****

```

Figure 1a

## 【図 1 b】

```

1057      GAGTGTATGCCGCAAGGGGAAAAATAGTAGTAGTGATGGTCAGTGGCGA
1037      GAGTGTATGCCGCAAGGGGAAAAATAGTAGTAGTGATGGTCAGTGGCGA
1057      *****
1037      ACAAGAACTATAGAAATGTTAAGGATTTGGAGGAATGAGTTTAAAAAG
1057      ACAAGAACTATAGAAATGTTAAGGATTTGGAGGAATGAGTTTAAAAAG
1057      *****
1037      AATAATTTAATCGATGATGATTCGGAGGCTACTGTCCGCAATCGGATTC
1057      AATAATTTAATCGATGATGATTCGGAGGCTACTGTCCGCAATCGGATTC
1057      *****
1037      GTTTTAA
1057      GTTTTAA
*****

```

Figure 1b

## 【図 2】

30kDa運動タンパク質 (aa 1~268) での BSG1037 (配列番号 5) と BSG1057 (配列番号 6) の配列の比較。不一致は、\_によって示され、そして配列の一致は、\*によって示される。

```

1037      MALVVKGVNINEFIOLTKMEKILPSMETPVKSVNCSKVOKIMVHENESL
1057      MALVVKGVNINEFIOLTKMEKILPSMETPVKSVNCSKVOKIMVHENESL
*****
1037      SGVNLKGVKLIDSGYVCLAGLVVTGEWNLPDNCRGGVSVCVLDKRMERA
1057      SGVNLKGVKLIDSGYVCLAGLVVTGEWNLPDNCRGGVSVCVLDKRMERA
*****
1037      DEATLGSYTTAAAKRFFQKVVFNIAITTDANKNVVQVLNIRNVKMSA
1057      DEATLGSYTTAAAKRFFQKVVFNIAITTDANKNVVQVLNIRNVKMSA
*****
1037      GFCPLSLEFVSVCIYVRNRIKGLREKINVRDGGPMELTEEVDDEFMED
1057      GFCPLSLEFVSVCIYVRNRIKGLREKINVRDGGPMELTEEVDDEFMED
*****
1037      VFMSIRLAKFRSRTGKKS DVRKGNSSDRSVFNKNYRNVDGGMSEFKK
1057      VFMSIRLAKFRSRTGKKS DVRKGNSSDRSVFNKNYRNVDGGMSEFKK
*****
1037      NNLIDDDSEATVAESDSF
1057      NNLIDDDSEATVAESDSF
*****

```

Figure 2

## 【図 3】

DNA配列10403 b.p. GTATTTTTTACAA...  
CGACTCACTATA環状  
126/183リーディング・フレームは、69で始まり、3417は、  
抑制的ストップ・コドン、そして4919で終了する。30K

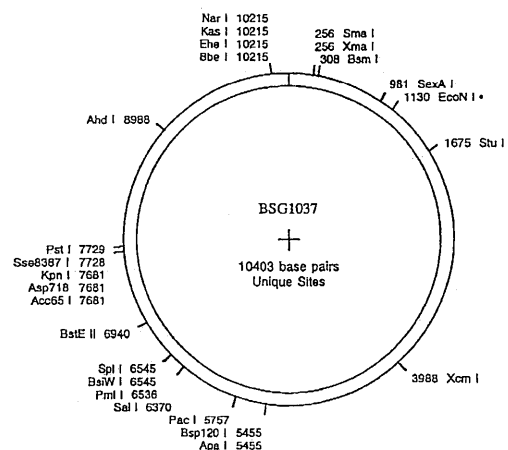


Figure 3

## 【図 4】

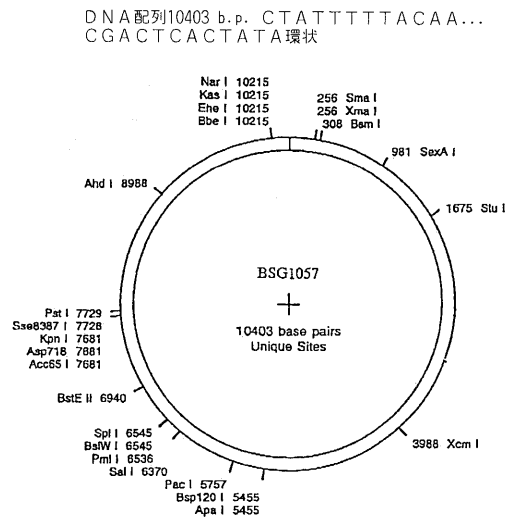


Figure 4

## 【図 5 a】

B S G 1037 の完全配列 (配列番号 1)

```

GTATTTTACAACAATTACCAACAACAACAAACAGACAACATTACAATTACTAT
TTACAATTACAATTGGCATAACA
CAGACAGCTACCAATCAGCTTTGCTGGACACTGTCGAGGAAACAACCTCTGGTTC
AATGATCTAGCAAAAGCGTCGTC
TTACGACACAGCGGTTGAAGAGTTTAACGCTGTCGACCGCAGGCCAAGGTGAAT
TTTCAAAAGTAATAAGCGAGGAGC
AGACGCTTATTTGCTACCGGCGTATCCAGAATTCCAATTTACATTTTATAACACGC
AAATGCCGTGCATTCGCTTGA
GGTGGATTGCGATCTTTAACTGGAATATCTGATGATGCAAAATCCCTACGGATCA
TTGACTTATGACATAGCGGGAA
TTTGCTATCGATCTGTTCAAGGACGAGCATATGTACACTGCTGCATGCCAACCT
GGACGTTTCGAGACATCATGCGGC
ACGAAGGCCAGAAAGACAGTATTGAACATACCTTTCTAGGCTAGAGAGAGGGGG
AAAACAGTCCCAACTTCCAAAG
GAAGCATTTGACAGATACGACAGAAATCTGAAGACGCTGCTGTCAATACTTTC
CAGACATGCGAACATCAGCCGAT
GCAGCAATCAGGACAGGTGTATGCCATTGCGCTACACAGCATATATGACATACCAG
CCGATGAGTTTCGGGCGGCGACTCT
TGAGGAAAAATGTCATACGTCATGCGCTTCCACTTCCGAGAACCTGCTTC
TTGAAGATTTCATGCGTCAATTTG
GACGAAATCAACGCGTGTTCGCGCGATGGAGACAAGTTGACCTTTCTTTTGCA
TCAGAGAGTACTCTTAATTAAGT
TCATAGTTATTTAATATTTCTTAAGTATGTGTGCAAACTTACTCCCGGCTCTAAT
AGAGAGGTTTACATGAAGGAGT
TTTAGTCACGAGTTAATACCTGGTTTGTAAAGTTTCTAGAATAGATCTTTCT
TTGTACAAAGGTTGCGCCAT
AAAAGTGTAGATAGTGAAGTGTATTAAGTCAATGGAAGCGCATGCGCAATACAA
AAAGCATCTTGTCAATGTCACAG
CGACGAAATCTCTTCGAGGATCATCATCAGTCAATTAAGTGTTCCTCCAAATGAG
GGATATGGTCATCGTACCAAT
TCGACATTTCTTTGGAGACTAGTAAGGAGCGCGCAAGGAAGTCTTAGTGCCAAGG
ATTTCTGTGTTTACAGTGCTTAAC
CACATTCGAACATACCGGCGAAAGCTTACATACGCAATGTTTGTCTTCGTC
GAATCGATTTCATCGAGGGAAT
CATTAACGCTGTGACGCGAGGTCCGAATGGGATGTGACAAATCTTGTACAAATC
CTTGTCCATGACGTTTACCTGC
ATACTAAGCTTGGCGTTTAAAGGATGACTTACTGATTAGCAAGTTTACTCTCGGT
CGAAAACGCTGTGCCAGCATGTG
TGGGATGAGATTTCGCTGGCGTTTGGGAACGCAATTCCTCCGTAAAGAGAGGCTC
TTGAACAGGAACTTATCAGAGT
GGCAGGCGACGATAGAGATCAGGCTGCTGATCTATATGTGACCTTCCACGACA
GATTAGTACTGAGTACAAGGCT
CTGTGGACATGCGCTGCGCTGACATAGGAAGAAGATGGAAGAAACGGAAGTGATG
TACAATGCATTTACAGAAATTATCG

```

Figure 5a

## 【図 5 b】

```

GTGTTAAGGGAGTCTGACAAATTCGATGTGTATGTTTTCAGATGTGCCAATCTT
TGGAAGTTGACCAATGACGGC
AGCGAAGGTTATAGTCGGGTATGAGCAATGAGAGCGGTCTGACTCTCACATTTGA
ACGACCTACTGAGCGAATGTTG
CGCTAGCTTTACAGGATCAAGAGAAGGCTTCAGAGGTGCATTTGGTAGTTACCTCAA
GAGAAGTTGAAGAACGTCATG
AAGGGTTCGATGGCCAGAGGAGATTACAATTAGCTGGTCTGCTGGAGATCATCGG
GAATCGTCTTCTTAAAGAACGA
GGAGATAGAGTCTTTAGAGCAAGTTTCATATGGCGACGCGAGATTCTGTTAATTCGTA
CGAGATGAGTCTGATTTGTGACA
CGGGTCCGATTAAAGTTTCAGCAAAATGAAAACTTTATCGATAGCTGTTAGCATCAC
TATCTGCTGCGGTTCGAATCTC
GTCAAGATCTCAAGAGATACAGTCTGATTGACCTTGAACCCGCTCAAAAGTTTGGGA
GTCTTGGATGTTGCATCAGGAA
GTGGTTAATCAAAACCAAGCGCAAGAGTCATGATGCGGGTGTGTTGAAACCCACG
CGAGGAAGTATCATGTCGCTT
TGGAATATGATGAGCAGGCTGTGTCATGCGATGATTGGAGAAGAGTAGCTGTT
AGCTCTGAGTCTGTTGTTATTC
GACATGGCGAACTCAGAACTCTGCGCAGACTGCTCGAAACGAGAACCGCATGT
CAGTAGCGCAAGGTTGTTCTGT
GGACGAGTTCGCGGCTGTGGAAAAACCAAGAAATCTTCCAGGGTAAATTTTGA
TGAAGATCTAATTTTATGACTG
GGAAGCAAGCGCGAAATGATCAGAAAGCTGCGAATTCCTCAGGGATTATTGTG
GCCACGAAGGACAACTTAAAC
GTTGATTCTTTCATGATGAATTTTGGAAAAAGCACACGCTGTCAGTTCAAGAGGTTA
TTCAATTGATGAAGGTTGATGTT
GCATCTGGTGTGTTAATTTCTTGTGGCGATGTCATTGTGCGAAATGTCATATGTT
TACGGAGACACACAGCAGATT
CATACATCAATAGAGTTTCAGGATTCCTGATCCCGCCCATTTTGCACAAATGGAAG
TTGACGAGGTGGAGACACGAGA
ACTACTCTCCGTTGTCCAGCGGATGTCACACATATCTGAACAGGAGATATGAGGGC
TTTGTCATGAGCACTTCTCGGT
TAAAGAGTCTGTTTCGACGAGATGGTGGCGGAGCCCGCTGATCAATCCGATCTC
AAAACCTTTGATGGCAAGATCT
TGACTTTTACCAATTCGATAAAGAGCTCTGCTTTCAGAGGGTATTCAGATGTTT
ACACTGTGCTGAAGTGCAGGC
GAGACATCTCTGATGTTCACTAGTTAGGTTAACCCCTACACCGGTCTCCATCATTG
CAGGAGACACCAATGTTT
GCTGCGATTGTCAGGACACCTGTTGCTCAAGTACTACATGTTGTTATGATGATC
TTAGTTAGTATCAATAGATC
TAGAGAACTTACGCTGCTGTTAGATATGTAAGTGCATGACGAGAACACAAAT
AGCAATTACAGATTGACTCGGT
TTCAAAGGTTCCAACTTTTGTGTCAGCGCAAGACTGGTGATATTTCTGATATGC
AGTTTACTATGATAAGTGTCT
CCAGGCAACAGCATGATGAATAATTTGATGCTGTACCATGAGGTTGACTGA
CATTTCAATGAATGTCAGAAAT

```

Figure 5b

## 【図 5 c】

```

GCATATTGGATATGTCTAAGTCTGTTGCTGCGCTAAGGATCAATCAAACTAA
TACCTATGGTACGACGCGGCA
GAAATGCCACGCGAGACTGGACTATTGGAATTTAGTGGCGATGATTAAGAAAGAA
CTTTAACGACCGGAGTTGCTGG
CATCATTTGATATGAAATCTGCACTCTTGGTTGATAGTAAGTTTGTGATGTTAT
TTGCTTAAAGAAAAAGAAAC
CAATAAAAAATGTTCTTGTTCAGTAGAGTCTCTCAATAGATGTTAGAAAAAGC
AGGAACAGGTAACAATAGGCCAG
CTCGAGATTTTGAATTTTGGATTGTCAGCAGTGTGATCAGTACAGACATGATT
AAAGCAACACCAACAAAGTT
GGACACTTCAATCAACAGGAGTACCCGGCTTTCGACAGATTTGTACCAATCAAA
AAAGATCAATGCAATATTCGGC
CGTTGTTTGTAGTACTTACTAGGCAATTAAGTGGACAGTGTGATTCGAGCAGATT
TTTGTTCACAGAAAGACACCA
GCGCAGATTGAGGATTTCTCGGAGATCTCGACAGTGTGTCGCGATGGATGCTTG
GAGCTGGATATCAAAATACGA
CAAAATCTCAGAAATGCAATGCTGTCAGTAGAATACGAGATCTGCGCAAGATTGG
GTTTCGAAGACTTCTTGGGAGAG
TTTGGAAACAGGGCATAGAAAGACCAACCTCAAGGATTATACCGCAGGTATAAA
ACCTGATCTGTTATCAAAAGAAAG
AGCGGGGACGTCACGAGCTTTCATGGAACACTGTGATCATGCTGCATGTTTGGCC
TCGATGCTTCGATGGAGAAAT
AATCAAGAGGAGCTTTTGGCTGACGATGCTGCTGACTTCCAAAGGGTGTGTA
GTTTCCGATGTGCAACACTCG
GCAATCTTATGTTGAATTTTGAAGCAAACTGTTTAAAAACAGTATGATACCTTT
CGGGAAGATATGTAATACATCAG
GACAGAGGATGCTGTTGTTGATTACGATCCCTAAAGTTGATCTCGAACTTGGTCT
AAACCATCAAGGATGGGAACA
CTTGAGGAGGTTTCAAGAGTCTCTTGTGATGTTGCTGTTTTCGTTGAACAAATGTCGG
TATTACACACAGTTGGACGAGC
TGTGATGGGAGGTTTCAAGACCGCCCTCCAGGTTGCTGTTTATAAAGTCTGG
TGAAGTATTGTTGATGATAAGT
CTTTTGAAGTTTGTATAGATGGCTAGTTTACCCTGTAAAGAGTGTATGTTGTCCAAAG
TTGATAAAATATGTTTATGAG
AATGAGTCAATTGTCAGGGGTGAACCTTCTTAAAGAGTTAAGCTTATTGATAGTGA
TACGCTGTTTATGCGGTTTGTG
CGTCAGGGGAGTGGAACTTGGCTGACAATTGACAGGAGGTTGAGCGGTGTGTC
TGGTGGACAAAAGGATGGAAAG
CCGACAGGACCACTTGGATCTTACTACACAGCAGCTGCAAGAAAGAAATTCAG
TTCAAGGCTGTTCCAAATGATCT
ATAACCAACCGGACGCGATGAAACGCTGCGCAAGTTTATGTTAATATAGAAAT
GTGAAGATGTGACGCGGTTCTG
CCGCTTCTCTGAGATTTGCTGCGGTGTGATTGTTTATAGAAATATATAAAATTA
GGTTTGAAGAGAGGATTACAA

```

Figure 5c

## 【図 5 d】

ACGTGAGAGACGGAGGGCCCATGGAACCTACAGAAGAAGTCGTTGATGAGTTCATG  
GAAGATGTCCCTATGTGCTACAGG  
CTTGCAAAAGTTTCGATCTCGAACCGGAAAAAGAGTGATGTCGCGAAAGGGAAAAA  
TAGTAGTAGTGATCGGTCACTGCC  
GAACAAGAACTATAGAAATGTTAAGGATTTTGAGGAATGAGTTTAAAAAGAATA  
ATTTAATCGATGATGATTCGGAGG  
CTACTGTCCCGGAATCGGATTCGTTTAAATAGATCTTACAGTATCACTACTCCATCT  
CAGTTCGTGTTCTTGCTATTA  
TTAAATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTACTGGAGTTGCCAAATCTTGTGTA  
ATTAGATGGTGATGTTAATGGG  
ACAAATTTTCTGTACGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACCGAAAGCTTACCC  
TTAAATTTATTTGCACTACTGGA  
AAACTACCTGTTCCTATGGCCAACTGTGCTACTACTTTCTTATGGTGTTCATGCT  
TTTCCCGTTATCCGGATCATAT  
GAAACGGCATGACTTTTCAAGATGGCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCA  
CTATATCTTTCAAAGATGACGGGA  
ACTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTGTTAATCGTATCG  
AGTTAAAGGTATTGATTTTAA  
GAAGATGGAACATTCTCGGACACAACTCGAGTACAACCTATAACTCACACAATGT  
ATACATCACGGCAGACAAACAAAA  
GAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGTTT  
AACTAGCAGACCAATTATCAAAAA  
ATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCACTTACCTGTGACAC  
AATCTGCCCTTTCGAAAGATCCC  
AACGAAAAGCGTGACCATATGGCCCTTCTTGAGTTTGAAGTGTCTGCTGGGATTACA  
CATGGCATGGATGAGCTCTCAA  
ATAATGACACTCGAGGGGTAGTCAAGATGCAATAAATAACGGATTGTGTCCGTA  
ATCACACGTGGTGGTACGATAAC  
GCATAGTGTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTGTGCTTGGATCGCGCGGGTC  
AAATGTATATGGTTTATATACAT  
CCGACGGCAGTAAATAAGCGAGGGGTTCCGGTTCGAGGTCCGCTGTGAAACTCGAA  
AAGGTTCCGGAAAAACAAAAAGAG  
AGTGGTAGGTAAATAGTCTTAAATAAGAAAAATAATAGTGGTAAGAAAGGTT  
TGAAAGTTGAGAAATTGAGGATA  
ATGTAAGTATGACGAGTCTATCGCGTATCGAGTACGTTTAAATCAATATGCCTTA  
TACAATCAACTTCCGAGCCAAAT  
TTGTTTACTTAAGTTCCGCTTATGAGATCCTGTGCAAGTGTCAATCTGTGTACAAA  
TGCAATGGGTAAACAGTTTCAA  
ACGCAACAAGCTAGGACAACAGTCCAACGCAATTTGCGGATGCCGGAACCTGT  
GCCATGATGACAGTGAAGTTTCC  
TGCAATCGGATTCTATGTGTATAGATATAATTCGACGCTTGATCCGTGATCACGGC  
GTTAATTAATAGCTTCGATACTA  
GAAATAGAATAATAGAGGTTGATAATCAACCCGACCCGAATACTACTGAAATCGTT  
AACGCGACTCAGAGGGTAGACGAT  
CGCACTGTAGCTATAAGGGCTTCAATCAATAATTGGCTAATGAAGTGGTTCGTGGA  
ACTGGCATGTTCAATCAAGCAAG

Figure 5d

## 【図 5 e】

CTTTGAGACTGTGACTGGACTGTCTGGACCACAACCTCCGGCTACTTAGCTATTGTG  
TGAGATTTCCTAAAAATAAGTC  
ACTGAAGACTTAAATTCAGGTGGCTGATACCAAAATCAGCAGTGGTTGTTCTGTC  
ACTTAAATATAACGATTGTCTATA  
TCTGGATCCAACAGTTAAACCATGTGATGGTGTATACTGTGGTATGGCGTAAACAA  
CGGAAAGTCCGCTGAAGACTTAA  
AATTCAGGGTGGCTGATACCAAAATCAGCAGTGGTGTGCTGCCACTTAAAAATAAC  
GATTGTCTATCTGTGATCCAA  
GTTAAACCATGTGATGGTGTATCTGTGTATGGCGTAAACAACGGAGAGGTTGCA  
ATCTCCCTTAAACCGCGGtagcg  
gcccc

Figure 5e

## 【図 6 a】

B S G 1057 の完全配列 (配列番号 2):

GTATTTTACAAATTTACCAACAACAACAACAACAGACAAACATTACAATT  
ACTATTTTACAATTACAATGGCATACACA  
CAGACAGCTACCAATCAGCTTTGCTGGACACTGTCCGAGGAAACAACCTCCT  
TGGTCAATGATCTAGCAAAAGCGTGTCT  
TTACGACACAGCGGTTGAAGAGTTTAAACGCTCGTGACCGCAGGCCAAAGGTG  
AACTTTTCAAAGTAATAAGCGAGGAGC  
AGACGCTATTGCTACCCGGGCGTATCCAGAATTCCAATTAATATTTATAAC  
ACGCAAAATGCCGTGCATTCGCTTGA  
GGTGGATTGGCATCTTTGAAGCTGGAATATCTGATGATGCAAAATCCCTACCG  
ATCATTTGACTTATGACATAGGCGGGAA  
TTTGCATCGCATCTGTTCAAAGGACGAGCATATGTACACTGCTGCATGCCCA  
ACCTGGACGTTGAGACATCATGCGGC  
ACGAAAGGCGAGAAAGACAGTATGAACCTATACCTTTCTAGGCTAGAGAGAGG  
GGGGAACACAGTCCCAACTTCAAAG  
GAAGCAATTTGACAGATACGCAAGAAATCCTGAAGACGCTGTCTGTCAACAATA  
CTTTCCAGACATGCGAACATCAGCGAT  
GCAGCAATCAGGACAGTGTATGCCATTGCGCTACACAGCATATATGACATA  
CCAGCCGATGAGTTCCGGCGGCACCTCT  
TGAGGAATAAGTTCCATACCGGCTATGCCGCTTCCACTTCCCGAGAACCTG  
CTTCTTGAAGATTCTCGGTCAATTG  
GACGAAATCAACGCGGTGTTTTCGCGCGATGGAGACAAGTTGACCTTTTCTT  
TGCATCAGAGAGTACTCTTAATTAAGT  
TCATAGTTATTCTAATTTAAAGTATGTTGCAAAACTTACTTCCGGGCTC  
TAATAGAGAGGTTTACATGAAGAGT  
TTTTAGTACCAGAGTTTAACTGTTTGTAAAGTTTCTAGAAATAGATACTT  
TTCTTTTGTACAAAGGTGTGGCCAT  
AAAAGTGTAGATAGTGAGCAGTTTATACTGCAATGGAAGACGCGATGGCAAT  
ACAAAAAGACTCTTGCAATGTGCAACAG  
CGAGAGAAATCCTCCTTGGGATTTCATCATCAGTCAATTAAGTGTTCCTCAAAA  
TGAGGGATATGGTTCATGATACCATAT  
TCGACATTTCTTTGGAGACTAGTAAGAGGACGCGCAAGGAAGTCTTAGTGT  
CAAGGATTTCTGTTTACAGTGTCTTAAAC  
CACATTCGAACATACGAGGCGAAAGCTTACATACGCAAAATGTTTGTCTT  
CGTCAATTCGATTCGATCGAGGGTAAT  
CATTAACGTTGTGACAGCGAGGTCCGAATGGGATGGGATGGACAAATCTTGTGA  
CAATCTCTTGTCCATGAGCTTTTAACTGTC  
ATACTAAGCTTCCGCTTCTAAAGGATGACTTACTGATTAGCAAGTTTGTCTC  
GGTTCGAAACCGGTGTGCGAGCATGTG  
TGGGATGAGATTTCGCTGGGTTTGGGAACGCAATTTCCCTCCGTGAAAGAGA  
GGCTCTTGAACAGGAACTTATCAGAGT  
GGCAGGCGACGCAATTAAGATCAGGCTGCTGATCTATATGTGACCTTCCAC  
GACAGATTAGTGAAGTCAAGAGCT  
CTGTGACATGCTGCGCTTGAATAGGAAGAGATGGAAGAACGGAAGT  
GATGTACAATGCATTTCAAGATTATCG

Figure 6a

## 【図 6 b】

GTGTTAAGGGAGTGTGACAAATTCGATGTTGATGTTTTTCCAGATGTGCCA  
ATCTTTGGAAGTTGACCAATGACGGC  
AGCGAAGGTTATAGTCCGGTCTAGGCAATGAGAGCGGTCTGACTCTCACA  
TTTGAACGACTACTGAGGCGAATGTTG  
CGCTAGCTTTACAGGATCAAGAGAAGGCTTCAGAAGGTGCATTGGTAGTTAC  
CTCAAGAGAAGTTGAAGAACCGTCCATG  
AAGGTTTCGATGGCCAGAGGAGGTTACAATAGCTGGTCTTGTGGAGATC  
ATCCGGAATCGTCTTATTCAAGAACGA  
GGAGATAGAGTCTTTAGACAGTTTCAATATGGCGACGGCAGATTCTGTAATTC  
GTAAGCAGATGAGTCTGATTGTGTACA  
CGGGTCCGATTAAAGTTGACGAAATGAAAACTTTATCGATAGCCTGTGAGC  
ATCACTATCTGCTGCGGTGTGCAATCTC  
GTCAGATCCTCAAAGATACAGCTGCTATGACCTTGAAACCCGTCAAAAAGT  
TTGGAGTCTTGGATGTTGCATCTAGGAA  
GTGGTTAATCAAACCAACGCCCAAGAGTCAATGATGAGGGGTGTTGTTGAAACC  
CACGCGAGGGAGTATCATGTGGCGCTTT  
TGGAATATGATGAGCAGGGTGTGGTACATGCGATGATTGGAGAAGAGTAGC  
TGTTAGCTCTGAGTCTGTTGTTTATTC  
GACATGGCGAACTCAGAACTTGCAGAGCTGCTTCGAAACCGGAGAACCCTG  
ATGTCAGTAGCGCAAGGTTGTTCTTGT  
GGACGAGTTTCCGGGCTGTGGAAAACCAAGAAATTTCTTCCAGGGTTAAT  
TTTGTGAGAGATCTAATTTTGTAGCTG  
GGAAGCAACGCGCGAAATGATCAGAAGACGTCGAATTCCTCAGGGATTAT  
TGTGGCCAGAGGACAACGTTAAAC  
GTTGATTCTTCTATGATGAATTTTGGAAAAGCACACGCTGTCAAGTCAAGAG  
GTTAATTCATGATGAAGGTTGATGTT  
GCATAGTGGTGTGTTAATTTCTTGTGGCGATGTCATTGTGCGAAATGCAAT  
ATGTTTACGGAGACACACAGCAGATT  
CATACATCAATAGAGTTTCAAGATTCCCGTACCCCGCCATTTTGCAAATTG  
GAAGTTGACGAGGTGGAGACACGAGA  
ACTACTTCCGTTGTCCAGCCGATGTCACACATTATCTGAACAGGAGATAGA  
GGGCTTGTGATGAGCATTCTTCCGT  
TAAAAAGTCTGTTTCCAGGAGATGGTCCGCGAGCCGCGGTGATCAATCG  
ATCTCAAAACCTTGCATGGCAAGATCC  
TGACTTTTACCAATCCGATAAAGAAAGCTCTGCTTTCAAGAGGATTCAGAT  
GTTCCACATGTGATGAAGTCAAGGC  
GAGACATACTCTGATGTTTCACTAGTTAGTTAACCCTACACCGGTCTCCAT  
CAITTCAGGAGACAGCCACATGTTT  
GGTCCATTGTGCAAGGACACCTGTTGCTCAAGTACTACACTGTGTTATGG  
ATCTTTAGTGTATCATAGAGATC  
TAGAGAACTTAGCTGATCTGTTAGATATGATAAGTTCGATGACGGAAC  
ACAATAGCAATTACAGATTGATCTCGGT  
TTCAAGGTTTCAATCTTTTGTGTCAGCGCCAAGACTGGTGATATTTCTGA  
TGTACAGTTTACTATGATAAGTGTCT  
CCAGGCAACAGCACCATGATGAATAATTTGATGCTGTACCATGAGGTG  
ACTGACATTTCAATGAATGTCAAAGATT

Figure 6b



【図 8】



Figure 8



## フロントページの続き

- (74)代理人 100108903  
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100141807  
弁理士 川幡 兼介
- (72)発明者 フィッツモーリス ウェイン ピー .  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 8 8 , ベイカビル, ラス エンシナス コート 1 2 1  
8
- (72)発明者 ボゲー, グレゴリー ピー .  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 8 8 , ベイカビル, トリルリック コート 4 1 9
- (72)発明者 リンドボー, ジョン エー .  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 8 8 , ベイカビル, サンダンス ドライブ 1 4 3

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 Gene , 1 9 9 6 年, Vol.173, pp.69-73  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 8 6 年, Vol.83, pp.5043-5047  
EMBO J. , 1 9 8 7 年, Vol.6, No.2, pp.307-311  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 8 6 年, Vol.83, pp.1832-1836  
ファルマシア , 1 9 9 5 年, Vol.31, No.1, pp.22-26

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/09  
A01H 5/00  
C12N 5/10  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
PubMed  
Cinii