

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5153983号
(P5153983)

(45) 発行日 平成25年2月27日(2013.2.27)

(24) 登録日 平成24年12月14日(2012.12.14)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19

請求項の数 38 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2001-585328 (P2001-585328)	(73) 特許権者	500563371
(86) (22) 出願日	平成13年5月18日 (2001.5.18)		デフヘン・ナムローゼ・フェンノートシャ ップ
(65) 公表番号	特表2004-524804 (P2004-524804A)		D E V G E N n v
(43) 公表日	平成16年8月19日 (2004.8.19)		ベルギー、9052 ゲントーウィナール デ、テヒノロジーパルク 30
(86) 国際出願番号	PCT/IB2001/001068	(74) 代理人	100094318
(87) 国際公開番号	W02001/088121		弁理士 山田 行一
(87) 国際公開日	平成13年11月22日 (2001.11.22)	(74) 代理人	100107456
審査請求日	平成20年5月16日 (2008.5.16)		弁理士 池田 成人
(31) 優先権主張番号	0012233.3	(74) 代理人	100148596
(32) 優先日	平成12年5月19日 (2000.5.19)		弁理士 山口 和弘
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100123995
前置審査			弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ベクター構築物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 第一のプロモータと、
b) 第二のプロモータと、
を含む DNA 構築物であって、
第一のプロモータ及び第二のプロモータは互いに対立して配位しており、
c) 第一のプロモータの 3' 末端下流及び第二のプロモータの 3' 末端下流に位置する、
インタープロモータ領域を定義し、
前記 DNA 構築物が、
d) インタープロモータ領域に位置する、少なくとも 1 つのクローニング部位と、
e) 2 本鎖 RNA 生成用テンプレートを形成するヌクレオチド配列を含み、前記少なくとも 1 つのクローニング部位に挿入された DNA 断片と、
f) 第一のプロモータの 3' 末端側から見て、第一のプロモータの下流及び少なくとも 1 つのクローニング部位の下流に位置する、少なくとも 1 つの第一の転写ターミネータとを更に含み、
前記第一の転写ターミネータは、第一のプロモータに操作的に連結されており、かつ、
インタープロモータ領域に位置している、前記 DNA 構築物。

【請求項 2】

g) 第二のプロモータの 3' 末端側から見て、第二のプロモータの下流及び少なくとも 1 つのクローニング部位の下流に位置する、少なくとも 1 つの第二の転写ターミネータで

10

20

あって、第二のプロモータに操作的に連結されている前記第二の転写ターミネータを更に含む、請求項 1 に記載の DNA 構築物。

【請求項 3】

第二の転写ターミネータが、インタープロモータ領域に位置している、請求項 2 に記載の DNA 構築物。

【請求項 4】

第二の転写ターミネータが、第二のプロモータの 3' 末端側から見て第二のプロモータの下流、少なくとも 1 つのクローニング部位の下流、及び第一のプロモータの 5' 末端下流に位置している、請求項 2 又は 3 に記載の DNA 構築物。

【請求項 5】

第二の転写ターミネータの 3' 末端が、第一のプロモータの 5' 末端から、2000 以下のヌクレオチド隔てられた、請求項 4 に記載の DNA 構築物。

【請求項 6】

第一の転写ターミネータが、第一のプロモータの 3' 末端側から見て、第一のプロモータの下流及び少なくとも 1 つのクローニング部位の下流に位置しており、第二の転写ターミネータが、第二のプロモータの 3' 末端側から見て、第二のプロモータの下流及び少なくとも 1 つのクローニング部位の下流に位置している、請求項 3 に記載の DNA 構築物。

【請求項 7】

第一のプロモータ及び第二のプロモータが、それぞれ独立に原核生物由来、真核生物由来、ファージ由来及びバクテリオファージ由来のプロモータからなる群より選択される、請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 8】

第一のプロモータと第二のプロモータが同一である、請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 9】

第一のプロモータと第二のプロモータが同一でない、請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 10】

第一のプロモータ及び第二のプロモータが、それぞれ独立に原核生物由来、真核生物由来、ファージ由来及びバクテリオファージ由来のプロモータからなる群より選択される、請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 11】

クローニング部位が、少なくとも 1 つの制限部位を含む、請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 12】

クローニング部位が、スタッファー DNA 配列の側面に位置している少なくとも 2 つの制限部位を含む、請求項 11 に記載の DNA 構築物。

【請求項 13】

少なくとも 2 つの制限部位が同一である、請求項 12 に記載の DNA 構築物。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの制限部位又は少なくとも 2 つの制限部位が、BstXI 部位である、請求項 11 乃至 13 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 15】

制限部位がXcmI 部位である、請求項 11 乃至 13 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 16】

クローニング部位が、attR1 及び attR2 組換え配列を更に含む、請求項 1 乃至 15 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 17】

クローニング部位が、ccdBヌクレオチド配列を更に含む、請求項 1 乃至 16 のい

10

20

30

40

50

れか一項に記載のDNA構築物。

【請求項18】

c c d Bヌクレオチド配列が、少なくとも1つのユニークな制限部位を更に含む、請求項17に記載のDNA構築物。

【請求項19】

少なくとも1つのユニークな制限部位が、平滑末端制限部位である、請求項18に記載のDNA構築物。

【請求項20】

平滑末端制限部位がS r f I部位である、請求項19に記載のDNA構築物。

【請求項21】

少なくとも1つのクローニング部位に挿入されたDNA断片を更に含む、請求項1乃至20のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項22】

プラスミド又はベクターである、請求項1乃至21のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項23】

配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12又は配列番号13に例示されたヌクレオチド配列を有する、請求項22に記載のプラスミド又はベクター。

【請求項24】

a) 第一のプロモータと、
b) 第二のプロモータと、
を含むDNA構築物であって、
第一のプロモータ及び第二のプロモータは互いに対立して配位しており、
c) 第一のプロモータの3'末端下流及び第二のプロモータの3'末端下流に位置している、インタープロモータ領域を定義し、
前記インタープロモータ領域が2本鎖RNA生成用テンプレートを形成するヌクレオチド配列を含み、

前記DNA構築物が、d) インタープロモータ領域に位置しており、かつ、第一のプロモータの3'末端側から見て、第一のプロモータの下流に位置する、第一の転写ターミネータ、を更に含み、

前記第一の転写ターミネータが第一のプロモータに操作的に連結されている、前記DNA構築物。

【請求項25】

g) インタープロモータ領域に位置しており、かつ、第二のプロモータの3'末端側から見て、第二のプロモータの下流に位置する、第二の転写ターミネータを更に含み、前記第二の転写ターミネータが第二のプロモータに操作的に連結されている、請求項24に記載のDNA構築物。

【請求項26】

第一のプロモータと第二のプロモータが同一である、請求項24又は25に記載のDNA構築物。

【請求項27】

第一のプロモータと第二のプロモータが同一でない、請求項24又は25に記載のDNA構築物。

【請求項28】

第一のプロモータ及び第二のプロモータが、それぞれ独立に原核生物由来、真核生物由来、ファージ由来及びバクテリオファージ由来のプロモータからなる群より選択される、請求項26又は27に記載のDNA構築物。

【請求項29】

RNA阻害に対する2本鎖RNAの生産方法であって、クローニング部位に挿入された

10

20

30

40

50

DNA断片、又は、2本鎖RNA生成用テンプレートを形成するヌクレオチド配列から2本鎖RNAを発現させるために、請求項1乃至28のいずれか一項に記載のDNA構築物を使用することを含む、方法。

【請求項30】

請求項1乃至28のいずれか一項に記載のDNA構築物を宿している菌株。

【請求項31】

前記菌株が大腸菌株である、請求項30に記載の菌株。

【請求項32】

RNA阻害に対する2本鎖RNAの生産のための、請求項30又は31に記載の菌株の使用。

10

【請求項33】

ヒト以外の生物におけるRNA発現の阻害方法であって、前記生物と、請求項1乃至28のいずれか一項に記載のDNA構築物を使用して生成した2本鎖RNAとを接触させることを含む、方法。

【請求項34】

前記生物が線虫である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記2本鎖RNAを前記生物に組み込まれるよう前記生物に供与することによって、前記生物と前記2本鎖RNAとを接触させる、請求項33又は34に記載の方法。

【請求項36】

20

ヒト以外の生物におけるRNA発現の阻害方法であって、前記生物と、請求項30又は31に記載の菌株とを接触させることを含む、方法。

【請求項37】

前記生物が線虫である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記菌株を前記生物に供与することによって、前記生物と前記菌株とを接触させる、請求項36又は37に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

30

本発明は、2本鎖RNAの発現に用いられる改良型ベクター構築物に関し、より詳細には、インビトロおよびインビボでの2本鎖RNAの発現に用いられる改良型ベクター構築物に関する。

【0002】

発明の背景

2本鎖RNA阻害(RNAi)効果の出現以来、遺伝子発現を制御するツールとして、WO 99/32619およびWO 00/01846に記述されるように、2本鎖RNA(dsRNA)の生成のために設計された専用ベクターの必要性が認識されている。

【0003】

ハイレベルのdsRNAを生成するために設計されたクローニングベクターについては、過去にPlaetinck他(WO 00/01846)およびTimmons他(Nature誌395~854(1998年))によって説明がなされている。これらのベクターは一般的にはマルチプルクローニング部位(MCS)を含み、向かい合わせの2つの転写プロモータが隣接するMCSに、目的とするDNA断片をクローニングすることができる。基本的に、これらの3つのコンポーネント(プロモータ1、MCSおよびプロモータ2)が全体システムを構成する。適切な発現システムでは、MCSにクローニングされたDNAが両方向に転写され、それによって2本の相補的RNA鎖が生成されることになる。

40

【0004】

周知のシステムの欠点は、クローニングされた断片以外も転写されてしまうということである。RNAポリメラーゼによる読み取りによって、ベクター全体が転写され、しかもそ

50

れは両方向での転写となる。クローニングされたDNA断片の転写に限って、RNAiに適した活性dsRNAが得られることになるので、上記ベクター部分の転写は、無用で非効率的なRNAをもたらす。より詳細には、これら転写の80%が非特異的であり、従って非効果的であるとみなすことができる。

【0005】

先行技術のプラスミドおよび発現システムによって生成される大量の非特異的RNAは、好ましくない副作用をもたらす。第1に、dsRNAを発現するE. coliのような導入媒体を介するC. elegansへのdsRNA導入に基づくRNAiプロトコルにおいて(WO 00/01846 参照)、大型のRNA鎖は導入媒体にとって有毒であると考えられる。結果として、E. coliに蓄積する大量のRNAが個体数の大部分を死滅させる。第2に、おそらく更に重要となるであろうが、阻害能力が低下することである。大量の非特異的dsRNAの存在により、特定配列に拮抗的な環境をもたらす。これらの非特異的領域が大きいので、例えばC. elegans細胞内で、テンプレートに従うdsRNA配列の、目的とするタンパク質の発現を阻止する能力は低下する。また、そのような非特異的dsRNAによる阻害については、Tushl他のGenes & Development 13: 3191-3197 (1999年)でもショウジョウバエで示されている。遺伝子発現を阻害する能力に影響を及ぼすだけでなく、特異的dsRNAの生成量を制限する。第3に、ベクターバックボーン部の転写、より詳細には、複製および関連構造の起点の転写は、プラスミドの不安定性とプラスミドの再組織化を招くので、dsRNA生成を減少させる。効果的なdsRNAの濃度がこのように比較的低いと、今度は非効率的なRNAiを招くことになる。

【0006】

結論として、上記ベクターには以下の欠点がある。すなわち、導入媒体にとって有毒である。転写による非特異的生成の比率が高まるほど、その非特異的領域の存在によってdsRNAの阻害能力が低下する。プラスミドが再組織化したり、プラスミドが導入媒体から欠損する率が高い。従って、本発明の目的は、dsRNA生成に関し、先行技術のベクターの欠点を回避する改良型ベクターを提供することである。

【0007】

RNA転写のインビトロ合成、例えばRNAプローブの生成で用いられるベクターは、かねてから当該技術分野では周知であり、普通に用いられてきた(例えば、F. M. Ausubel 他(編集人)による Current Protocol in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., 1994年); Jendrisak 他の米国特許第4,776,072号、クローン化DNA配列の一方の鎖のRNAコピーをインビトロで生成するためのベクター)。標準的なインビトロ転写プロトコルでは、一般的に、所望の転写物の3'末端に位置する制限部位で転写ベクターを線形化することにより、ベクター配列の転写の読み取り問題を回避する。しかしながら、テンプレートが両方向に転写されることが重要であるインビボ転写またはdsRNA生成にとってこの解決策は適切ではない。

【0008】

ここで、本発明は、dsRNA生成のための先行技術のベクターが遭遇する問題に対し、転写ターミネータの活用に基づく新規の解決策を提案する。概要を述べると、この解決策は、少なくとも1つのプロモータに操作的に連結された少なくとも1つの転写ターミネータの活用から成り、ターミネータは、プロモータが開始する転写を阻止する。そしてプロモータの3'末端とターミネータの5'末端との間に挿入されたどのDNA断片も転写され、ベクターバックボーンの望ましくない転写は行わない。以下で更に述べるように、ベクターは2つのプロモータおよび2つのターミネータで構成されることが好ましい。

【0009】

従って、本発明の第一の局面によれば、インタープロモータ領域に隣接する向かい合わせの2つのプロモータを含むDNA構築物が提供され、この構築物は更に、前記プロモータのうち一方のプロモータの転写領域下流に位置する少なくとも1つの転写ターミネータを含む。詳細には、本発明は、以下を含むDNA構築物を提供する：

a) 第一のプロモータ、および

10

20

30

40

50

b) 第二のプロモータ

を含み；

第一および第二のプロモータは相互に反対の配向にあり、かつ

c) 第一のプロモータの 3' 末端の下流で、かつ第二のプロモータの 3' 末端の下流に位置するインタープロモータ領域を画成し；

DNA 構築物は更に；

d) インタープロモータ領域に位置する少なくとも 1 つのクローニング部位；および

e) 第一のプロモータの下流で、かつ少なくとも 1 つのクローニング部位の下流に位置する (第一のプロモータの 3' 末端から見た場合) 第一の転写ターミネータ；を含み、第一の転写ターミネータは第一のプロモータに操作的に連結される。

10

【0010】

インタープロモータ領域は更に、以下の領域として画成することも可能である：第一のプロモータの 3' 末端と第二のプロモータの 3' 末端との間の DNA 領域とし、この領域は、第一のプロモータの下流で、かつ第二のプロモータの下流にあり、第一のプロモータおよび第二のプロモータの 5' 末端を含まないことが好ましい。向かい合わせの第一のプロモータおよび第二のプロモータは、それぞれの 5' 末端から 3' 末端の方向への発現を促して 3' 末端の下流で転写を開始し、それによってインタープロモータ領域に存在するヌクレオチド配列の両鎖の転写が行われる。

【0011】

本発明の DNA 構築物内にある 2 つのプロモータは同一であっても異なってもよく、基本的にどのようなタイプであってもよい。この構築物で用いられるプロモータの厳密な性質は、DNA 構築物が機能すると予想される発現システムの性質に依存する (例：原核生物対真核生物宿主細胞)。バクテリオファージプロモータ、例えば、T7、T3 および SP6 プロモータは、適切な RNA ポリメラーゼとの結合にのみ依存する高レベルな転写を可能にする利点を備えているので、本発明の構築物での使用に好ましい。それらのプロモータは個々に独立して選択することができる。また、ファージプロモータは多様な宿主システム、すなわち、原核生物および真核生物宿主の両方で機能できる。但し適切なポリメラーゼが宿主細胞に存在するものとする。

20

【0012】

インタープロモータ領域に隣接する「向かい合わせの」2 つのプロモータ構造は、一方のプロモータが転写の開始を促すことによってインタープロモータ領域のセンス鎖が転写され、他方のプロモータが転写の開始を促すことによってインタープロモータ領域のアンチセンス鎖が転写されるようになっており、この構造は、当該技術分野、例えば、Promega Corp (米国ウィスコンシン州マディソン) のベクターの pGEM7 シリーズで周知の構造である。

30

【0013】

本発明の DNA 構築物が先行技術のそれと異なる点は、一方のプロモータの転写領域下流に位置する少なくとも 1 つの転写ターミネータが存在することである。以下で説明するように、転写ターミネータは、一方向性または双方向性であり、一方向性あるいは双方向性ターミネータの選択は、インタープロモータ領域の内外のどちらにターミネータを配置するかによって影響を受ける。ターミネータは、原核生物や真核生物由来のターミネータであっても、ファージ由来のターミネータであってもよい。バクテリオファージターミネータ、例えば T7、T3 および SP6 ターミネータが特に好ましい。唯一の要件は、ターミネータが転写領域下流に位置することに関連して、プロモータで開始される転写をターミネータが終結させることができなくてはならないことである。実際に、それらはプロモータとターミネータが「機能的組み合わせ」を形成しなくてはならない。すなわち、プロモータで始動する RNA ポリメラーゼのタイプに対してターミネータが機能的でなくてはならないことを意味する。一例を挙げると、真核生物 RNA polymerase II プロモータと真核生物 RNA polymerase II ターミネータは一般的に機能的組み合わせを形成する。バクテリオファージプロモータおよびターミネータを本発明の構築物に用いる場合、ファージプロモータと

40

50

ターミネータは両方ともポリメラーゼ特有であるので、機能的組み合わせの選択が特に重要になる。機能的組み合わせを形成するためには、プロモータとターミネータの両方が同一のポリメラーゼにとって特異的であるのがよい。例えば、T7プロモータとT7ターミネータ、T3プロモータとT3ターミネータ等。

【0014】

一実施の形態において、本発明のDNA構築物は、第一のプロモータの下流で、かつ少なくとも1つのクローニング部位の下流に配置された（第一のプロモータの3'末端から見た場合）単体の転写ターミネータを含み、第一の転写ターミネータは第一のプロモータに操作的に連結され、単体の転写ターミネータはインタープロモータ領域に配置されるように成してもよい。

10

【0015】

代替の編成では、DNA構築物はインタープロモータ領域外に配置された単体の転写ターミネータを含む。更に別の実施の形態では、DNA構築物が2つの転写ターミネータを含み、それぞれを2つのプロモータの一方の転写領域下流に配置させる。この構造では、何れか一方または両方のターミネータをインタープロモータ領域内に配置してもよい。本発明のDNA構築物におけるこのような様々な実施の形態については、添付図面を参照して以下でより詳細に説明する。また、インタープロモータ領域外の第一の転写ターミネータの位置を更に以下のように、すなわち、第一のプロモータの下流で、少なくとも1つのクローニング部位の下流であり、かつ第二のプロモータの5'末端の下流に第一の転写ターミネータが位置する（第一のプロモータの3'末端から見た場合）ように定めてもよい。

20

【0016】

また、インタープロモータ領域外の第二の転写ターミネータの位置を更に以下のように、すなわち、第二のプロモータの下流、少なくとも1つのクローニング部位の下流、および第一のプロモータの5'末端の下流に第二の転写ターミネータが位置する（第二のプロモータの3'末端から見た場合）よう定めてもよい。

【0017】

更に、ターミネータがインタープロモータ領域に配置されない場合、第一のプロモータの5'末端と第二のターミネータの3'末端との距離、または第二のプロモータの5'末端と第一のターミネータの3'末端との距離を短くすることが好ましく、言い換えれば、第一の転写ターミネータの3'末端をヌクレオチド2000個以下分だけ第二のプロモータの5'末端から離間させるが、好ましくはヌクレオチド1000個以下分で、更に好ましくはヌクレオチド500個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド200個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド100個以下分で、特に一層好ましくはヌクレオチド50個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド20個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド10個以下分で、特にヌクレオチド6個以下分である。

30

【0018】

更に、第二の転写ターミネータがインタープロモータ領域外に配置される場合、好ましくは第二の転写ターミネータの3'末端をヌクレオチド2000個以下分だけ第一のプロモータの5'末端から離間させるが、好ましくはヌクレオチド1000個以下分で、更に好ましくはヌクレオチド500個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド200個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド100個以下分で、特に一層好ましくはヌクレオチド50個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド20個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド10個以下分で、特にヌクレオチド6個以下分である。

40

【0019】

先に定義されたように、用語「インタープロモータ領域」は、2つのプロモータ間のDNA配列すべてを意味する。上記で説明したように、本発明の特定の実施の形態では、転写ターミネータがインタープロモータ領域内にあってもよい。インタープロモータ領域は、有利になるようにdsRNA生成用テンプレートを形成するヌクレオチド配列を含んでもよい。この配列の厳密な長さおよび性質は本発明において重要ではない。本発明は更に、インタープロモータ領域がクローニング部位を含むDNA構築物を提供する。dsRNA

50

生成用テンプレートを形成するDNA断片を2つのプロモータ間に挿入する際に、クローニング部位はそれを促す機能を有する。従って本発明では、dsRNA生成のためのテンプレートベクターの構築物で汎用的な一連のクローニングベクターを提供する。また、クローニングベクターはクローニング部位へ挿入されたDNA断片を有し、そのようなクローニングベクターに由来するベクターも本発明の適用範囲に含まれる。

クローニング部位は更に、以下を1つ以上含んでもよい：

- 少なくとも1つの制限部位（当該技術分野で周知である）、または1つ以上の更なる制限部位（例：マルチプルクローニング部位を提供する（当該技術分野で周知である））；
- スタッファーDNA（例：2つのBstXI制限部位、または2つのXcmI制限部位等、少なくとも2つの制限部位が隣接する）；
- attR1およびattR2組換え部位；
- ccdBヌクレオチド配列；
- 更にSrfI制限部位等、少なくとも1つの特異的平滑末端制限部位を備えるccdBヌクレオチド；および/または
- 少なくとも1つのクローニング部位に挿入されるDNA断片。

本発明で提供されるすべてのDNA構築物が、有利になるように、例えばプラスミドベクター等の複写可能なクローニングベクターの一部を形成してもよい。向かい合わせのプロモータ、インタープロモータ領域および転写ターミネータだけでなく、ベクター「バックボーン」は更に、複写可能なベクターで共通して見られる特徴、例えば抗生物質耐性遺伝子等の宿主細胞および選択マーカー内での自律複製を可能にする複製起点等を1つ以上有する。選択マーカー遺伝子（例：抗生物質耐性遺伝子）自体はプロモータおよび転写ターミネータを有してもよいが、それらは本発明で必要なプロモータおよびターミネータエレメントとは全く無関係であり、特定のベクターが本発明の適用範囲内に収まるか否かを判定する際に考慮に入れるものでないことは言うまでもない。

【0020】

本発明によるDNA構築物は、当該技術分野において周知の、例えばF. M. Ausubel他（編集人）のCurrent Protocol in Molecular Biology（John Wiley & Sons, Inc., 1994年）に記載されるような標準的な組換え技術を用いたコンポーネント配列エレメントから容易に構築され、当該技術分野に精通する者は以下の本発明の詳細な説明および添付の実施例からそれを理解できるであろう。

【0021】

以下の概略図を参照して、本発明によるDNA構築物についてここで詳細に説明する。

【0022】

図を参照すると、図1（A）は本発明による第一のDNA構築物で、向かい合わせの2つのプロモータ、すなわちインタープロモータ領域c）にそれぞれ隣接する第一のプロモータa）および第二のプロモータb）を含むプラスミドベクターを略示し、インタープロモータ領域は第一のプロモータの3'末端の下流で、かつ第二のプロモータの3'末端の下流にある。第一のプロモータおよび第二のプロモータは同一であっても異なってもよい。本実施の形態は、第一の転写ターミネータe）および第二の転写ターミネータf）を含み、両者ともインタープロモータ領域内に位置する。この実施の形態では、第一のターミネータおよび第二のターミネータは一方向性ターミネータであることが好ましい。

【0023】

DNA断片を少なくとも1つのクローニング部位d）に挿入してもよい。このような断片が、第一のプロモータa）および第二のプロモータb）の誘導により転写される（すなわち両鎖が転写される）ことで、挿入されたDNA断片の2本鎖RNAと結合する2つのRNA断片が生成される（インビトロおよびインビボの両方で）。

【0024】

ゲノムDNA配列、cDNA配列、その他コード配列等、所望のDNA配列が少なくとも1つのクローニング部位に挿入される。何れの特定の説明に制限されることなく、a）およびe）が機能的組み合わせを形成する場合、a）で転写を開始するRNAポリメラーゼ

10

20

30

40

50

は、少なくとも1つのクローニング部位、および少なくとも1つのクローニング部位に挿入されるDNA断片を含むインタープロモータ領域を転写し、RNAポリメラーゼがe)に到達すると転写を終結させられると考えられている。同様に、b)で転写を開始するRNAポリメラーゼは、少なくとも1つのクローニング部位、および少なくとも1つのクローニング部位に挿入されるDNA断片を含むインタープロモータ領域を転写し、RNAポリメラーゼがf)に到達すると転写を終結させられる。ターミネータは、RNAポリメラーゼが転写を中断、停止して、テンプレートから解離するようにさせる。これによってベクターバックボーンの無制限な転写が阻止され、重要でないDNAの非特異転写を抑制する。

【0025】

インタープロモータ領域は更に、2本鎖RNA阻害に対して目的に合致したヌクレオチド配列を含む。この配列は目的とする断片に対して「TF」と呼ばれる。dsRNAに転写される場合、この配列は目的とする遺伝子の特異的2本鎖RNA阻害を担う。目的とする断片はゲノムDNAの断片または目的とする遺伝子のcDNAから形成してもよい。その厳密な長さおよびヌクレオチド配列は本発明において重要ではない。

【0026】

図1(A)に示す編成において、2つのターミネータはインタープロモータ領域内でTFの何れかの側に位置する。各ターミネータはそれぞれ一方のプロモータの転写領域下流に位置し、第一のターミネータe)は第一のプロモータa)の転写領域下流に位置し、第二のターミネータf)は第二のプロモータb)の転写領域下流に位置する。上記のようにa)およびe)が機能的組み合わせを形成すると考えると、a)で転写を開始するRNAポリメラーゼはTFまで含むインタープロモータ領域を転写し、e)に到達すると転写を終結する。同様に、b)で転写を開始するRNAポリメラーゼは反対側の鎖のTFまで含むインタープロモータ領域を転写し、f)に到達すると転写を終結する。ターミネータは、RNAポリメラーゼが転写を中断、停止して、テンプレートから解離するようにさせる。これによってベクターバックボーンの無制限な転写が阻止され、重要でないDNAの非特異転写を抑制する。

【0027】

このベクターから生じた転写物は、ベクター内のターミネータの厳密な配置に依存し、TF領域に対応するほぼ完全な特異的dsRNAである。挿入されたDNA断片の両側にあるTF領域の下流末端にターミネータ配列を直接配置することにより、転写物の長さはテンプレートに従った配列の長さのままで完全に短かくされる。従って、より多くの特異的dsRNAが得られる。ここで更に、ベクターバックボーンの非転写によりDNA構築物はより安定する。後者の特性(安定性)と、ここで相対的に高くなった特異的転写率とが相まって、より多くの短い特異的dsRNA鎖を合成するのに好適なシステムが提供される。このように転写物の量が比例して増加すると、特異的dsRNAの濃度が高まり、RNAiプロトコルにおける阻害効果が増す。導入媒体におけるdsRNAの発現に基づくRNAiプロトコルでは、RNAの発現の増加によって導入媒体にもたらされる毒性レベルが、このベクターの使用により最低レベルとなる。

【0028】

本発明者がRNAiの応用に最適な構造であるとみなしている、図1(A)に示すタイプのベクターの特定の実施例は、付帯する実施例で説明するプラスミドpGN9aである。ベクターは向かい合わせの2つのT7プロモータを含むので、pGN9で用いられる転写ターミネータはT7RNAポリメラーゼ特有のターミネータである。しかしながら、T3またはSP6プロモータ、ターミネータ、ポリメラーゼ、あるいは別の原核生物または真核生物プロモータ、ターミネータに基づく発現システム等、別のシステムを使用することもできる。

【0029】

図1(B)は本発明による更なるDNA構築物であって、インタープロモータ領域c)に隣接する向かい合わせの2つのプロモータa)およびb)を含むプラスミドベクターを概

10

20

30

40

50

略的に示す。このベクターは2つの転写ターミネータe)およびf)を含むが、この構造では2つのターミネータがインタープロモータ領域外に位置し、実際にここではターミネータエレメントが2つのプロモータに隣接する。e)はa)の転写領域下流であり、またf)はb)の転写領域下流となるような構造である。ここで繰り返すがe)は、a)が開始する転写を終結させ、またf)は、プロモータb)が開始する転写を終結させる。図1(A)のように、プロモータ間にターミネータを配置するために一方向性ターミネータが好ましいとされる構造とは異なり、d)の外側にターミネータを配置することで、一方向性ターミネータだけでなく双方向性ターミネータを用いることが可能となる。本発明に従って多くの双方向性ターミネータを用いることができるが、それらは当該技術分野において周知である。一般的に、これらはポリメラーゼに対して非特異的であるとみなされている。

10

【0030】

図1(B)に示す実施の形態では、dsRNA生成のための先行技術のベクターに対し、図1(A)に示す利点と基本的に同様の利点を提供する。図1(B)に示すベクターでは、プロモータ領域をも含むわずかに長い転写物となる。このように転写物の長さに比較的小さな相違があっても、それによって、形成されたdsRNAはRNAiシステムの効率に重大な影響を及ぼすことはない。

【0031】

図1(B)に示す実施例では、プロモータの5'末端をヌクレオチド2000個以下分だけ転写ターミネータの3'末端から離間させるようにターミネータおよびプロモータの位置が近接していることが好ましいが、好ましくはヌクレオチド1000個以下分で、更に好ましくはヌクレオチド500個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド200個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド100個以下分で、特に一層好ましくはヌクレオチド50個以下分で、更に一層好ましくはヌクレオチド20個以下分で、特に好ましくはヌクレオチド10個以下分で、特にヌクレオチド6個以下分である。

20

【0032】

図1(C)は本発明による更なるDNA構築物であって、インタープロモータ領域c)に隣接する向かい合わせの2つのプロモータa)およびb)を含むプラスミドベクターを概略的に示す。本実施の形態では、一方のターミネータ(この場合e))はc)の内側に位置し、他方のf)はc)の外側に位置する。繰り返すが、e)は、a)が開始する転写を終結させ、f)は、プロモータb)が開始する転写を終結させる。この構造では、一方のターミネータが逆方向のポリメラーゼの活性を阻害するという問題(例：f)はb)が開始する転写を妨げる)に対して有効な解決策を提供する。このベクターは基本的に、先行技術に対して図1(a)および図1(b)に示す様々なベクターと同様の利点を提供する。一方のプロモータを転写することにより転写物の長さに比較的小さな相違があっても、RNAiシステムの効率に重大な影響を及ぼすことはない。これは、先に定めたように、インタープロモータ領域c)の外側に配置されたターミネータがプロモータに近接している場合に、より顕著となる。

30

【0033】

図1(D)および図1(E)は本発明による更なる2つのDNA構築物を概略的に示す。両方ともインタープロモータ領域c)に隣接する向かい合わせの2つのプロモータa)およびb)を含むプラスミドベクターである。これらの実施の形態は、単体ターミネータだけを含む。図1(D)に示す構造では、a)からの転写を終結させる単体ターミネータe)をc)外に配置する。IPRの外側にターミネータを配置することにより、このシステムで双方向性ターミネータあるいは一方向性ターミネータの何れであっても用いることができるようになる。図1(D)に示す実施の形態では、e)がc)内に配置される。従って、a)を一方向性ターミネータとすることが好ましい。

40

【0034】

本発明によるDNA構築物の更なる実施の形態については、図2(B)乃至図2(E)で概略的に示す。

50

【 0 0 3 5 】

これらの実施の形態はすべて、図 1 (A) に示すプロモータおよびターミネータの最適編成に基づくプラスミドクローニングベクターであり、上記のように、少なくとも 1 つのクローニング部位へ、DNA 断片を挿入することを促すクローニング部位を含む。

【 0 0 3 6 】

これらの実施の形態はすべて、図 1 (A) に示すプロモータおよびターミネータの最適編成に基づくプラスミドクローニングベクターであり、インタープロモータ領域へ、目的とする DNA 断片を挿入することを促すクローニング部位を含む。

【 0 0 3 7 】

図 2 (A) は、比較のために加えた、先行技術のクローニングベクターの概略図である。このベクターは向かい合わせの 2 つのプロモータ a) および b) を含むが、両方が同一であっても異なってもよく、マルチクローニング部位 (M C S) に隣接する。

10

【 0 0 3 8 】

図 2 (B) は本発明によるプラスミドクローニングベクターの第一のタイプを示す。ベクターはインタープロモータ領域に隣接する向かい合わせの第一のプロモータ a) および第二のプロモータ b) を含む。インタープロモータ領域は更に、以下の領域として定めることも可能である。すなわち第一のプロモータの 3 ' 末端と第二のプロモータの 3 ' 末端との間を DNA 領域とし、この領域は、第一のプロモータの下流で、かつ第二のプロモータの下流にあり、第一のプロモータおよび第二のプロモータの 5 ' 末端を含まないことが好ましい。インタープロモータのプロモータ領域は更に、マルチクローニング部位 (M C S) に隣接するターミネータ e) および f) を含む。M C S は少なくとも 1 つの単独の制限部位、好ましくは当該技術分野で周知の制限部位を 2 つ以上含み、その何れも DNA 断片の挿入に用いてもよい。

20

【 0 0 3 9 】

図 2 (C) は本発明によるプラスミドクローニングベクターの更に異なるタイプを示す。繰り返すがこのベクターは、ターミネータ e) および f) を含むインタープロモータ領域に隣接する、向かい合わせのプロモータ a) および b) を含む。本実施の形態では a) および b) は、P C R 断片のクローニングを促すように成されたクローニング部位に隣接し、2 つの同一の制限部位 (この場合 B s t X I 部位) が隣接するスタッファード DNA を含む。スタッファード DNA の特異的配列はそれほど重要ではない。但し、前記スタッファード DNA が本発明の DNA 構築物における所望の効果および / または所望の活性を阻害しないものとする。ここでは、本発明のこのような局面によるベクターの実施例として、プラスミド p G N 2 9 について説明する。

30

【 0 0 4 0 】

B s t X I 認識部位および B s t X I アダプタを用いる P C R 産物のクローニングは、一般的に当該技術分野で周知である。B s t X I アダプタは、Invitrogen (Groningen, オランダ) 等から市販されている。これらのアダプタはより簡単で効率的に P C R 産物をベクターにクローニングするために設計されたノンパリンδροーム (非回文) 配列のアダプタである。このように、これらのアダプタを用いると、非相補的な (C A C A) オーバーハングを有することにより、アダプタまたはインサート DNA 同士の連結が減らされる。スタッファード DNA が組み込まれているのは、単に B s t X I で切断されるベクターと切断されないベクターとの差別化を、その大きさに基づき容易に行えるようにするためである。その厳密な長さおよび配列は重要ではない。

40

【 0 0 4 1 】

図 2 (D) は本発明によるプラスミドクローニングベクターの更に異なるタイプを示す。繰り返すがこのベクターは、ターミネータ e) および f) を含むインタープロモータ領域に隣接する、向かい合わせのプロモータ a) および b) を含む。本実施の形態において a) および b) は、制限酵素切断および連結ではなく相同的組換えに基づく「高スループット」クローニングを促すクローニング部位に隣接する。図 2 (D) で概略的に示すように、クローニング部位は、E. coli に対する致死性遺伝子 (この場合 c c d B 遺伝子) に隣

50

接するバクテリオファージラムダの a t t R 1 および a t t R 2 組換え部位を含む。

【 0 0 4 2 】

D N A 断片をこのベクターにクローニングする代替方法（図 2（D）では不図示）は、このベクターの変形から成り、c c d B D N A 配列は更に少なくとも 1 つの特異的制限部位を含み、その少なくとも 1 つの特異的制限部位は S r f I 制限部位等の平滑末端制限部位であることが好ましい。その少なくとも 1 つの特異的制限部位へ D N A 断片を挿入すると、c c d B 遺伝子の不活性化、更には致死性 c c d B 遺伝子の不活性化を招く。

【 0 0 4 3 】

図 2（D）に示すベクターの更なる変形には、a t t R 1 および a t t E 2 が存在しない。このようなベクターは少なくとも 1 つのクローニング部位を含み、前記少なくとも 1 つのクローニング部位は c c d B 配列から成り、前記 c c d B 配列は更に少なくとも 1 つの特異的制限部位を含み、その少なくとも 1 つの特異的制限部位は S r f I 制限部位等の平滑末端制限部位であることが好ましい。その少なくとも 1 つの特異的制限部位へ D N A 断片を挿入すると、c c d B 遺伝子の不活性化、更には致死性 c c d B 遺伝子の不活性化を招く。

【 0 0 4 4 】

c c d B ヌクレオチド配列および / または a t t R 部位（R 1 および / または R 2）を含むこれらのクローニング部位は、Life Technologies, Inc. が市販する Gateway™ クローニングシステムから得られる。Gateway™ クローニングシステムについては、Hartley 他 WO 96 / 40724（P C T / U S 96 / 10082）で詳細に説明されている。ここに記載の本発明のこの局面によるベクターの実施例は p G N 39 である。

【 0 0 4 5 】

図 2（E）および図 2（F）は本発明による更に別のタイプのプラスミドクローニングベクターを示す。繰り返すがこのベクターは、ターミネータ e）および f）を備えるインタープロモータ領域 c）に隣接する、向かい合わせのプロモータ a）および b）を含む。図 2（E）に示す実施の形態において e）および f）は、T A™ クローニングによる P C R 産物の「高スループット」クローニングを促すクローニング部位に隣接する。このクローニング部位は、2 つの同一の制限部位が隣接するスタッファー D N A を含み、この 2 つの同一の制限部位に特有の酵素は、オーバーハングする T ヌクレオチドを生成する。この場合、制限部位は X c m I 部位であるが、その他に、オーバーハングする T ヌクレオチドを生成するために切断された部位を用いても同様の効果が得られる。オーバーハングする T ヌクレオチドは、オーバーハングする A ヌクレオチドを含む P C R 産物のクローニングを促す。この原理は T A™ クローニングとして周知である。オーバーハングする T ヌクレオチドに酵素トポイソメラーゼを連結させることで、オーバーハングする T ヌクレオチドに、切断されたベクターを「トポメライズ」することができ、図 2（F）で概略的に示すタイプのクローニングベクターを生成する。また、その結果生じたベクターは、T O P O™ クローニングとして周知の原理によって P C R 産物のクローニングを促す。

【 0 0 4 6 】

T O P O™ および T A™ クローニングシステムは両方とも本発明で説明したベクターに関するものではないが、Invitrogen から市販されている。T O P O™ クローニングシステムについては、Shuman WO 96 / 19497（P C T / U S 95 / 16099）で詳細に説明されている。T A™ クローニングシステムについては、Hernstadt 他 WO 92 / 06189（P C T / U S 91 / 07147）で詳細に説明されている。

【 0 0 4 7 】

図 2（B）乃至図 2（F）では、図 1（A）で示すタイプのベクター内に別のクローニング部位を組み込んだものを示すが、これらのクローニング部位は本発明の何れの D N A 構築物（図 1（B）乃至図 1（E）で概略的に示される D N A 構築物を含む）にも組み込むことができることは、当該技術分野に精通した読者であれば容易に理解できよう。

【 0 0 4 8 】

R N A i 技術における本発明の D N A 構築物の用途

10

20

30

40

50

前述のように、本発明のDNA構築物/ベクターは、RNAi技術で用いる2本鎖RNAの生成において主として適用される。詳細には、この構築物はネマトーダ線虫*C. elegans*のインビボRNAiプロトコルで有用である。

【0049】

*C. elegans*では、従来からdsRNAを線虫に注入することによりRNAiを行っていた。これらの方法については、国際出願番号WO 99 / 3 2 6 1 9でFire他により詳細に説明されている。一言で言えば、市販のインビトロ転写キットを用いて、RNAの両鎖をインビトロで生成する。RNAの両鎖はdsRNAを形成することが可能となり、その後dsRNAが*C. elegans*に注入される。本発明者が開発した新しいベクターシステムは、従来方法に大幅な改良を加えた。第一に、例えばベクターpGN9等は2つの同一プロモータを用いて、1つのステップでRNAを生成することができる。第2に、より重要であるが、ターミネータが存在することで、クローン化された目的の断片に限って転写が行われるので、転写物およびそれに伴って形成されたdsRNAはより特異的となる。この結果、より効率的なRNAiが得られる。

10

【0050】

*C. elegans*でRNAi実験を行うための更なる方法については、Plaetinck他のWO 00 / 0 1 8 4 6で説明されている。この方法では、dsRNAを生成するバクテリアを*C. elegans*線虫に与える。あたかもdsRNAが注入されたかのように、dsRNAは線虫の腸バクテリアを通過し、同様のRNAiを誘発する。これらの実験に関しては、*E. coli*株はHT115 (DE3)であることが好ましく、*C. elegans*株はnuc-1; gun-1であることが好ましい。また、有効なdsRNAに限って生成されるので、以下の実施例で示すように、本発明によって提供される改良型ベクターはこの方法におけるRNAiの効率も向上させる。

20

【0051】

また、RNAiを行う別の方法が、Plaetinck他のWO 00 / 0 1 8 4 6で説明されている。一言で言うと、この方法は線虫自体でdsRNAを生成することに基づくものである。これは、上記のベクターに線虫プロモータを用いることによって行うことができる。またベクターに存在する非*C. elegans*プロモータに対して特異的なポリメラーゼを発現するトランスジェニック(形質転換)線虫を用いることもでき、このポリメラーゼがdsRNAの転写を促すようにする。プロモータは、T7、T3、SP6 RNAプロモータ等、周知のバクテリオファージRNAプロモータから選択することが好ましく、それによって適切なポリメラーゼの結合にのみ依存する高レベル転写を実現させる利点を提供する。

30

【0052】

幾つかの方法によってプラスミドベクターDNAを線虫に導入することができる。第一に、従来の注入方法(EpsteinおよびShakes編集のMethods in Cell Biology, Vol 48, *C. elegans* Modern Biological Analysis of an organism)によってDNAを導入することができる。第二に、DNA供給によりDNAを導入することができる。WO 00 / 0 1 8 4 6でPlaetinck他が示すように、プラスミドの宿主である*E. coli*株を線虫に与えることにより線虫にプラスミドDNAを導入することができる。*E. coli*株はOP50またはMC1061もしくはHT115 (DE3)であることが好ましいが、その他の株でも本目的に適する。*C. elegans*株はnuc-1変異株またはnuc-1; gun-1株であることが好ましい。*E. coli*のプラスミドDNAは腸バクテリアを通過してネマトーダに導入され、その結果、dsRNAが発現する。上記の他のRNAi方法と同様に、新しいベクターシステムを用いることで、特異的dsRNAに限定して生成することができ、RNAiを向上させる。

40

【0053】

下記のその他の図と共に、以下の実験例を参照して本発明は更に理解されるだろう。

【0054】

実施例1 - ベクター構築物

ここで例示するベクター構築物の開始点は、プラスミドpGN1であった。このプラスミ

50

ド（出願人の同時係属国際出願番号WO 00/01846に記載）はマルチクローニング部位に隣接する向かい合わせの2つのT7プロモータを含む。

【0055】

ベクター構築物は、当該技術分野において周知の、例えば F. M. Ausubel 他（編集人）の Current Protocols in Molecular Biology（1994年 John Wiley & Sons, Inc.）で説明される標準的な分子生物学技術に従って実行された。

【0056】

1) pGN9の構築物

最初に、制限酵素 EcoRI および KpnI によって pGN1 を切断した。オリゴヌクレオチド oGN27 および oGN28（図7）をアニーリングすることで2本鎖断片を生成し、その後 EcoRI / KpnI で切断されたベクターに結合させた。その結果生じたプラスミドを、XbaI および HindIII によって再び切断した。オリゴヌクレオチド oGN29 および oGN30 をアニーリングすることで2本鎖断片を生成し、その後 XbaI / HindIII で切断されたベクターにアニーリングさせた。その結果生じたベクターは pGN9 と呼ばれた（図4および図10）。

【0057】

2) 更なるクローニングベクター構築物

pGN9のMCSを、BstXI部位が隣接するスタッファーDNAに置換することによって pGN29（図9（A）；図11）が生成された。BstXIアダプタは、Invitrogen（Groningen, オランダ）から市販されている。

【0058】

pGN39（図9（B）；図12）は以下のステップで生成された：pGN29をBstXIで切断した。BstXIアダプタ（Invitrogen（Groningen オランダ））がGATEWAYTMシステム（Life Technologies, Inc.）によって提供されたCassette Aに結合された。Cassette AはattR1、CmR、CcdA、CcdB、attR2を含む。アダプタを有するCassette Aは、その後切断したpGN29に結合され、pGN39Aとなる。pGN39AはccdB遺伝子に特異的SrfI部位を含む。

【0059】

TopoRNAiベクター（図9（C）；図13）は以下の方法で生成された：pGN29をBstXIで切断した。プライマoGN103およびoGN104ならびにテンプレートpCDM8（Invitrogen（Groningen, オランダ））を用いてPCRを行い、XcmI部位を含むスタッファーが生成された。PCR産物にBstXIアダプタが結合され、その結果生じたライゲーション産物はBstXIによって切断したpGN29ベクターに結合し、TopoRNAiベクターとなる。

oGN103 : 5' TACCAAGGCTAGCATGGTTTATCACTGATAAGTTGG 3'

oGN104: 5' TACCAAGGCTAGCATGGGCTGCCTGAAGGCTGC 3'

である。

【0060】

pGN49Aを構築して特異的非平滑制限部位を追加して挿入し、CmR遺伝子pGN39を消失させた。オーバーラップPCRを行った。1回目のPCRはプライマoGN126およびoGN127ならびにテンプレートとしてpGN39Aを用いて行った。プライマoGN128およびoGN129ならびに同様のテンプレートを用いて、第2断片を生成した。その結果生じた断片およびプライマoGN126PおよびoGN129Pを用いてオーバーラップPCRを行い、最終PCR産物を得た。このような最終PCR産物を得るために、BstXIアダプタを結合させ、BstXIで切断したpGN29にライゲーション産物を結合させた。その結果生じたベクターはpGN49Aと呼ばれる。

【0061】

コントロールベクターを生成し、pGN49Aクローニングベクターの効率を試験した。このようなベクターはT7ターミネータではなくT7プロモータを含むものとする。この

10

20

30

40

50

ため p G N 4 9 A の X b a I インサートは切り離され、同様の制限酵素で切断した p G N 1 にクローニングされた。その結果生じたベクターは p G N 5 9 A と呼ばれる。

oGN126 pGATCTGGATCCGGCTTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGC

oGN127 GGAGACTTTATCGCTTAAGAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACC

oGN128 :

CCAGTGCACGTCTCTTAAGCGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTTACCCGGTGG

oGN129 pGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATCCCCAG

である。

【 0 0 6 2 】

実施例 2 - R N A における改良型ベクターの実用性を示す

この実験の目的は、先行技術で周知のベクターと比較して、2本鎖 R N A 阻害における本発明の改良型ベクターの効率が向上したことを示すことであった。生成される d s R N A が有効であるほど、R N A i 機能も向上するので、システム効率の大幅な上昇が見込まれた。コンセプト実験のこのような実証に関する実験システムは、d s R N A を供給した p G N - 2 (- ターミネータ) および p G N - 1 2 (+ ターミネータ) と共にコントロール兼ダイリュータとしての P G N - 1 (空ベクター) を用いた s u p 3 5 の R N A i によって、n u c - 1 / p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s C. elegans 変異体中 2 5 での C. elegans 生存率を測定することである。p h a - 1 t s / s u p - 3 5 変異については Schnabel の W O 9 9 / 4 9 0 6 6 で詳細に説明されている。

【 0 0 6 3 】

C. elegans の n u c - 1 変異によって、野生型 C. elegans よりも優れた取り込み能力 (d s R N A 複合体の取り込み等) を示す C. elegans 株を提供する。この変異体を主要 D N A s e で消失させる。本発明者は先の同時係属出願で、ネマトーダに d s R N A を供給することにより、この C. elegans 株が R N A i の向上をもたらすと証明している。

【 0 0 6 4 】

p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s 変異によって、変異体 C. elegans 株に 1 5 で生存し、2 5 で死滅する表現型を提供する。s u p - 3 5 発現の阻害によってこの致死性を抑制できる。従って、s u p - 3 5 の R N A i は、2 5 で p h a - 1 (e 2 1 2 3) の生存を助けるものがよい。s u p - 3 5 から d s R N A を発現させる場合、本発明のベクターは、2 5 での p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s 変異体の生存率では、ターミネータを含まないベクターと比較して s u p - 3 5 R N A i の効率を上昇させるものがよい。

【 0 0 6 5 】

空ベクターとしてベクター p G N 1 が用いられた。ベクター p G N 2 (- ターミネータ) は s u p - 3 5 D N A の宿主となり、適切な宿主に導入された場合に s u p - 3 5 d s R N A を発現させるベクターである。このベクターには転写ターミネータを挿入しない。ベクター p G N 1 2 (+ ターミネータ) は上記のようなベクターで、転写ターミネータを含み、それによって適切な宿主に導入された場合に改良型 d s R N A が生成される。従って、このベクターは 2 つの一方方向性転写ターミネータを有し、両ターミネータともインタープロモータ領域内に配置され、s u p - 3 5 断片に隣接する。後者のベクターを用いることで、システム効率の上昇 (ここでは 2 5 で p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s 変異体の生存率が向上することを意味する) が見込まれた。

【 0 0 6 6 】

実験条件

1 2 ウェルのマイクロタイタープレートに 1 ウェルにつき約 2 m l の N G M アガーで満たした。(1リットルの N G M アガー: アガー 1 5 g と、ペプトン 1 g と、N a C l 3 g と、コレステロール溶液 1 m l (5 m g / m l i n E t O H) とをオートクレーブした後、0 . 1 M C a C l ₂ 9 . 5 m l と、0 . 1 M M g S O ₄ 9 . 5 m l と、1 M K H ₂ P O ₄ / K ₂ H P O ₄ バッファ (p H 6) 2 5 m l と、アンピシリン (1 0 0 μ g / l) と、0 . 1 M I P T G 5 m l と、ナイスタチン溶液 5 m l (1 : 1 E t O H : C H ₃ C O O N H ₄ 7 . 5 M に 1 0 m g / m l で溶解) とを無菌状態で加える。

【 0 0 6 7 】

プラスミドによって形質転換したバクテリア H T 1 1 5 (D E 3 : F i r e A , C a r n e g i e I n s t i t u t i o n 、 メ リ ー ラ ン ド 州 ボ ル チ モ ア) の 一 夜 培 養 液 約 5 0 μ l を 乾 いた プ レ ー ト に た ら す 。 1 日 目 は 、 生 育 段 階 L 4 の ネ マ ト ー ダ を そ れ ぞ れ 1 つ づ つ ウ ェ ル に 載 せ た 。 各 ウ ェ ル に ネ マ ト ー ダ (P 1) 1 個 と す る 。 2 日 目 に 、 P 1 ネ マ ト ー ダ を 新 し い ウ ェ ル に の せ 、 一 日 放 置 し て 培 養 さ せ る 。 同 様 の 手 順 を 3 日 目 も 繰 り 返 し た 。 す べ て の プ レ ー ト を 2 5 で 更 に 培 養 し 、 子 孫 を 形 成 さ せ た 。 子 孫 数 を カ ウ ン ト し て 、 S u p 3 5 R N A i に 誘 発 さ れ た 生 存 数 を 測 定 し た 。

【 0 0 6 8 】

結果

s u p - 3 5 d s R N A を 発 現 さ せ る E . c o l i を 与 え 、 C . e l e g a n s n u c - 1 / p h a - 1 (e 2 1 2 3) t s 変 異 体 に お け る R N A i 実 験 で あ る 。

【 0 0 6 9 】

【 表 1 】

セットアップ:

コントロールとしてのpGN1

pGN2 (sup 35 - Term.)

pGN12 (sup 35 + Term.)

pGN2 + pGN1 希釈 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

10

pGN12 + pGN1 希釈 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

条件:

インキュベーション温度 25°C

読み出し:

子孫のカウント (成体雌雄同株)

20

pGN1 (コントロール)

1日目	0	0	0	0
2日目	0	0	0	0
3日目	0	0	0	0

pGN2 (希釈なし)

1日目	12	4	48	32
2日目	24	23	80	85
3日目	5	0	9	16

pGN12 (希釈なし)

1日目	16	29	37	14
2日目	27	22	57	2
3日目	1	2	4	1

30

pGN 2+1, 1/2 希釈

1日目	0	7	0	2
2日目	9	10	0	3
3日目	0	2	0	0

pGN 12+1, 1/2 希釈

1日目	22	28	103	61
2日目	36	45	53	40
3日目	3	3	25	1

40

pGN 2+1, 1/4 希釈

1日目	28	23	0	0
2日目	6	3	0	0
3日目	0	0	0	0

pGN 12+1, 1/4 希釈

1日目	*	6	36	5
2日目		24	55	3
3日目				

10

pGN 2+1, 1/8 希釈

1日目	0	0	4	0
2日目	0	0	11	0
3日目	0	0	0	0

pGN 12+1, 1/8 希釈

1日目	31	12	16	38
2日目	4	5	37	4
3日目	0	0	2	1

20

pGN 2+1, 1/16 希釈

1日目	0	0	0	0
2日目	0	0	0	1 少量
3日目	0	0	0	0

pGN 12+1, 1/16 希釈

1日目	1	0	0	0
2日目	2	0	0	1
3日目	0	1	1	1

30

pGN 2+1, 1/32 希釈

1日目	0	0	0	0
2日目	0	0	0	0
3日目	0	0	0	0

pGN 12+1, 1/32 希釈

1日目	0	0	1	0
2日目	0	L2	3	0
3日目	2	0	L3- L4	0

40

* 母死

結論

予測したように、pGN 1の宿主であるバクテリアを与えた線虫では、この温度でのp h a - 1変異の致死効果に因り、生存能力のある子孫は確認されなかった。pGN 2またはpGN 12の宿主であるE. coliをネマトーダに与えると、何れの場合も生存能力のある子孫が確認された。これはsup - 35のdsRNAを線虫に与えたことによる。2つの

50

供給実験における顕著な違いは希釈列において見られる。pGN2の宿主であるバクテリアを、pGN1の宿主であるバクテリアで希釈する場合、1/2の低希釈度であっても子孫数は激減する。この希釈列は、適切なRNAiを誘発するためには高レベルdsRNAが必要であることを示唆する。pGN12の宿主であるバクテリアを用いた供給実験では、1/8の希釈度でもかなりの数の子孫が観察されている。これは、pGN12の宿主であるバクテリアにおいて、より一層効果的なdsRNAが形成されることを示唆する。ベクターに上記のようなdsRNAを発現させるターミネータ配列を加えることで、RNAi効果の発生において大きな利点を提供することを、この実験が明確に示している。

【0070】

実施例3：T7ターミネータ(pGN49対pGN59)を用いた場合と、用いない場合のベクターのRNAi効率を比較する

10

3種類の異なる遺伝子をベクターpGN49AおよびpGN59Aにクローニングした。平滑末端を作るPfuI DNAポリメラーゼで遺伝子断片を増幅してクローニングを行うようにし、これらのベクターでクローニングを促した。このようなPCR断片はSrfIで切断したベクターにクローニングされた。クローンに正しい断片が挿入されたことがPCRによって確認された。ds発現およびRNAiによって、子孫の表現型が致死性となるよう断片を選択する。この手順によって素早く容易にRNAiにおける2つのベクター(pGN49、pGN59)の効率を比較することが可能となる。

【0071】

【表2】

20

プラスミド	遺伝子(acedb)	ベクター バックボーン5
pGW5	B0511.8	pGN49A
pGW9	C01G8.7	pGN49A
pGW11	C47B2.3	pGN49A
pGW17	B0511.8	pGN59A
pGW21	C01G8.7	pGN59A
pGW23	C47B2.3	pGN59A

30

40

標準的手法によって、すべてのプラスミド(pGW系列)をE. coli AB301-105 (DE3)バクテリアで形質転換させる。その後LB/amp中で37℃に保ち、14~18時間バクテリアを繁殖させる。これらの培養物を遠心分離機にかけ、バクテリアのペレットは1mM IPTGおよび100μg/μlアンピシリンを含有するS完全バッファに溶解した。

【0072】

100μlのS-完全バッファ(終濃度1mM IPTGおよび100μg/μlアンピ

50

シリンを含有する) および $10 \mu\text{l}$ のバクテリア溶液を含む 96 ウェルプレートにおいて、3 個のネマトーダを各ウェルに入れた。ネマトーダは L1 生育段階のものであった。プレートは 25℃ で 5 ~ 6 日間培養された。幼虫の発育や子孫 F1 の発生についてプレートを毎日検査する。

【 0 0 7 3 】

結果

構築された各プラスミドに対して 8 倍の効率で RNAi が行われた。この結果は、T7 ターミナータをベクターバックボーンに挿入すると、予測された表現型が 100 % 発生することを示す。T7 ターミナータを用いない場合、再現性は最大 50 % まで低下することもある。その前の実験と同様に、結果では、ターミナータを追加することにより RNAi 機能が著しく向上することを示す。

10

DNA断片	B0511.8	B0511.8	C01G8.7	C01G8.7	C47B2.3	C47B2.3
ベクター	pGN49A	pGN59A	PGN49A	pGN59A	pGN49A	pGN59A
発生プラスミド	PGW5	PGW17	PGW9	PGW21	PGW11	PGW23
致死率	100	75	100	87.5	100	50
子孫発生率	0	25	0	12.5	0	50

【 0 0 7 4 】

【 表 3 】

20

テンプレート pCDM8上で、oGN103及びoGN104プライマーによって
作り出されたPCR断片

TACCAAGGCT AGCATGGTTT ATCACTGATA AGTTGG
ATAAGTTGGT GGACATATTA TGTTTATCAG TGATAAAGTG TCAAGCATGA
CAAAGTTGCA GCCGAATACA GTGATCCGTG CCGGCCCTGG ACTGTTGAAC
GAGGTCGGCG TAGACGGTCT GACGACACGC AAAGTGGCGG AACGGTTGGG
GGTGCAGCAG CCGGCGCTTT ACTGGCACTT CAGGAACAAG CGGGCGCTGC
TCGACGCACT GGCCGAAGCC ATGCTGGCGG AGAATCATAC GCTTCGGTGC
CGAGAGCCGA CGACGACTGG CGCTCATTTT TGATCGGGAA TCCCGCAGCT
TCAGGCAGGC CCATGCTAGC CTTGGTACCA GCACAATGG

10

20

pGN49Aを作り出すために使われた、オーバーラップ
PCR断片

gatctggatccggcttactaaaagccagataacagtatgcgtatattgcgcgctg
atatttgcggtataagaatatataactgatatgtatacccggaagtatgtcaaaaa
gaggtgtgctatgaagcagcgtattacagtgacagttgacagcgcagctatca
gttgctcaaggcatatatgatgtcaatatctccggtctggtaagcacaacccatg
cagaatgaagcccgtcgtctgcgtgccgaacgctggaaagcggaaaatcaggaa
gggatggctgaggtcgcccggtttattgaaatgaacggctcttttgcgtgacgag
aacagggactggtgaaatgcagtttaagggttacacctataaaagagagagccg
ttatcgtctgtttgtggatgtacagagtgatattattgacacgcccgggcca
cggatggtgatccccctggccagtgacgctctcttaagcgataaagtctccc
gtgaactttaccgggtggtgcatatcggggatgaaagctggcgcatgatgac
caccgatatggccagtggtgcccgtctccgttatcggggaagaagtggctgat
ctcagccaccgcgaaaatgacatcaaaaacgccattaacctgatgttctggg
gaatataaatgtcaggctcccttatacacagc

30

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】 (A)乃至(E)は、本発明によるDNA構築物のそれぞれ異なる実施の形態の概略図であり、プロモータおよび転写ターミネータエレメントの相対的配置を示す。

【図 2】 (A)は、比較のために付した、先行技術のクローニングベクターの概略図で

50

ある。(B)乃至(E)は、本発明によるDNA構築物の更なる実施の形態の概略図であり、インタープロモータ領域内の異なるクローニング部位の活用を示す。

【図3】 pGN1を図示(プラスミドマップ)する。

【図4】 pGN9を図示(プラスミドマップ)する。

【図5】 プラスミドpGN1の断片のヌクレオチド配列を図示し、向かい合わせのT7プロモータの位置を示すために注釈をつけた。

【図6】 T7転写ターミネータのヌクレオチド配列を示す。

【図7】 T7転写ターミネータをpGN1に挿入するために用いるオリゴヌクレオチド配列、oGN27、oGN28、oGN29、oGN30を示し、T7polターミネータ配列の位置および様々な制限部位の位置がマークされている。

10

【図8】 プラスミドpGN9の断片のヌクレオチド配列を図示し、向かい合わせのT7プロモータおよびT7転写ターミネータの位置を示すために注釈をつけた。

【図9】 (A)は、pGN29を図示(プラスミドマップ)し、(B)はpGN39を図示(プラスミドマップ)し、(C)はプラスミドTopoRNAiを図示(プラスミドマップ)する。

【図10】 プラスミドpGN9の完全なヌクレオチド配列を示す。

【図11】 プラスミドpGN29の完全なヌクレオチド配列を示す。

【図12】 プラスミドpGN39の完全なヌクレオチド配列を示す。

【図13】 プラスミドTopoRNAiの完全なヌクレオチド配列を示す。

【図14】 プラスミドpGN49Aの完全な配列を示す。

20

【図15】 プラスミドpGN59Aの完全な配列を示す。

【図16】 pGN49Aを図示(プラスミドマップ)する。

【図17】 pGN59Aを図示(プラスミドマップ)する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DEVGEN NV

<120> VECTOR CONSTRUCTS

<130> SCB/55178/001

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Fragment of
pGN1 containing opposable T7 promoters

<400> 1

```

ttgtaatacg actcactata gggcgaattc gagctcggta cccggggatc ctctagagtc 60
gaaagcttct cgccctatag tgagtcgtat tacagcttga gtattctata gtgtcaccta 120
aatagcttgg cgtaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt 160

```

<210> 2

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: DNA sequence
containing a T7 terminator

<400> 2

```

actagcataa ccccttgagg cctctaaaac ggtcttgagg gggttttttg 49

```

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide oGN27

<400> 3

```

aattcaaaaa acccctcaag acccgtttag aggccccaag gggttatgct agtgaattct 60
gcagcggtag 70

```

<210> 4

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

10

20

30

40

Oligonucleotide oGN28

<400> 4
 cgctgcagaa ttactagca taaccoccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt 60
 tg 62

<210> 5
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN29

10

<400> 5
 ctagacgctg aagcttacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt 60
 ttttg 65

<210> 6
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN30

<400> 6
 agctcaaaaa acccctcaag acccggttag aggccccaag gggttatgct agtaagctta 60
 cgcgt 65

20

<210> 7
 <211> 230
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Fragment of
 plasmid pGN9 containing opposable T7 promoters and
 T7 transcription terminators

<400> 7
 ttgtaatacg actcactata gggcgaattc aaaaaacccc tcaagaccog ttagaggcc 60
 ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaccggggg atcctctaga cgcgtaagct 120
 tactagcata accccttggt ggcctctaaac gggctcttgag ggggtttttg agcttctcgc 180
 cctatagtga gtcgtattac agcttgagta ttctatagtg tcacctaaat 230

30

<210> 8
 <211> 3323
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGN9

<400> 8
 gaggcgacca tatgogggtg gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
 ggcgaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacagc 120
 tcatttttta accaatagcg cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaataagacc 180
 gagatagggt tgagtgttgt tcagtttggg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240

40


```

tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 300
cccaaatcaa gttttttgcg gtccaggtgc cgtaaagctc taaatcgga ccctaaaggg 360
agcccccgat ttagagcttg acggggaaaag ccggcgaaag tggcgagaaa ggaagggaag 420
aaagcgaaag gagcgggcgc tagggcgctg gcaagtgtag cgggtcacgt gcgcgtaacc 480
accacaacccg ccgcgcttaa tgcgcgcgta cagggcgcggt ccattcgcca ttcaggctgc 540
gcaactgttg ggaaggcgga tccgtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaaag 600
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgcccagg gttttcccag tcacgacgtt 660
gtaaaacgac ggccagtga tttgtaatac actcactata gggcgaaattc aaaaaacccc 720
tcaagacccg ttttagagcc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtacccgggg 780
atcctctaga cgcgtaagct tactagcata accccttggg gcctctaaac gggctcttag 840
gggttttttg agcttctcgc cctatagtga gtcgtattac agcttgagta ttctatagt 900
tcacctaatt agcttggcgt aatcatgtgc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 960
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 1020
atgagtgcgc taactcaaat taattgcgtt gcgctcactg ccgctttcc agtcgggaaa 1080
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 1140
tgggcgctct tccgcttcc cgtcactga ctgcctgcgc tcggctcgtt ggctgcggcg 1200
agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 1260
aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt 1320
gctggcggtt ttcgataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 1380
tcagagggtg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 1440
cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc 1500
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 1560
cgctcgtccc aagctggggt gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 1620
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 1680
agccactggt aacagatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 1740
gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa 1800
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaaa ccaccgctgy 1860
tagcgggttg tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 1920
agatcctgtt atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaaat cacgttaagg 1980
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 2040
aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaccttg tctgacagtt accaatgctt 2100
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgocctgact 2160
cccgctcgtg tgataaacta cgatacggga gggcttaacca tctggcccca gtgctgcaat 2220
gataccgoga gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgy 2280
aagggccgag cgcagaagtg gtccgcaac tttatccgc tccatccagt ctattaattg 2340
ttcgggggaa gctagagtaa gtagttcgc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttggcat 2400
tgctacaggc atcgtgggtg cagcctcgtc gtttgggtat gcttcattca gctccggttc 2460
ccaacgatac aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 2520
cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 2580
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttctg tgactgggta 2640
gtactcaacc aagtcattct gagaataccg cgcggcgga ccgagttgct cttgcccggy 2700
gtcaatacgg gataatagtg tatgacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 2760
acgttcttcg gggcgaaaaa tctcaaggat cttacogctg ttgagatoca gttogatgta 2820
acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 2880
agcaaaaaa ggaaggcaaa atgcccgaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg 2940
aatactcata ctcttccttt ttcaataatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 3000
gagcgatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia atagggttc cgcgacatt 3060
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 3120
aaataggcgt atcacgagc cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 3180
ctgacacatg cagctcccg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag 3240
acaagcccg cagggcgcg cagcggtgtg tggcggtgt cggggtggc ttaactatgc 3300
ggcatcagag cagattgtac tga 3323

```

<210> 9

<211> 3774

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGN29

10

20

30

40

<400> 9

```

gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcgaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatcagc 120
tcatttttta accaatagggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 180
gagataggggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccaactacg tgaacccatca 300
cccaaataca gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcgga ccctaaaggg 360
agccccgat ttagagcttg acggggaaaag ccggcgaaag tggcgagaaa ggaagggaag 420
aaagcgaaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgttaac 480
accacaccgg ccgcgcttaa tgcgcgcgta cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc 540
gcaactgttg ggaagggcga tcgggtcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaaag 600
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt 660
gtaaaaacgc ggcacgtgaa ttgtaatacg actcactata gggcgaattc aaaaaacccc 720
tcaagaccgg tttagaggcc coaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaccggggg 780
atcctctaga gatccctcga cctcgagatc cattgtgctg gcgcggatc tttatcactg 840
ataagtttgt ggacatatta tgtttatcag tgataaagtg tcaagcatga caaagttgca 900
gccgaataca gtgatccgtg ccggccctgg actggtgaac gaggtcggcg tagacggctc 960
gacgacacgc aaactggcgg aacggttggg ggtgcagcag ccggcgcttt actggcactt 1020
caggaacaag ccggcgctgc tcgacgcact ggccgaagcc atgctggcgg agaatacatc 1080
gttcggtgc cgagagccga cgacgactgg cgctcatctc tgatcgga tccccagct 1140
tcaggcaggc gctgctcgcc taccgccagc acaatggatc tcgagggatc ttccatacct 1200
accagttctc gcctgcagg tcggcgccgc gactctctag acgcgtaagc ttactagcat 1260
aaaccttgg ggctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gagcttctcg ccctatagtg 1320
agtctatta cagcttgagt attctatagt gtccactaaa tagcttggcg taatcatggg 1380
catagctgtt tctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg 1440
gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt 1500
tcgctcact gccgcctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcac taatgaatcg 1560
gccaacgcgc ggggagaggc ggtttcgta ttggcgctc ttcgcttcc tcgctcactg 1620
actcgctcgc ctgggtcgtt cggctcgggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa 1680
tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaagaa catgtgagca aaaggccagc 1740
aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgotggcggt ttcgatagg ctccgcccc 1800
ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat 1860
aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctctgtt ccgaccctgc 1920
cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct 1980
cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgcto caagctgggc tgtgtgcacg 2040
aacccccgt tcagcccgac cgctgcgct tatccggtaa ctatcgtctt gactccaacc 2100
cggtaagaca cgacttatcg coactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 2160
ggtatgtagg cgtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc taccatagaa 2220
ggacagttat tggatctcgc gctctgctga agccagttac ctccgaaaaa agagttggta 2280
gtctctgac cgcaaaaaa accaccgctg gtagecgtgg tttttttgtt tgcaagcagc 2340
agattacgc ggataaaaaa ggatctcaag aagatccctt gatctttct acggggtctg 2400
acgctcagtg gaacgaaaaa tcacgttaag ggattttgt catgagatta tcaaaaagga 2460
tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg 2520
agtaaaactg gtcctgacag taccaatgct taatcagtg ggcacctatc tcagcgatct 2580
gtctatttgc ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg 2640
agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agacccaacg tcaccggctc 2700
cagatttacc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa 2760
ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgcggga agctagagta agtagttcgc 2820
cagttaatag tttgcgcaac gttgttggca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt 2880
cgtttgggat ggttcattc agctccggtt cccaacgac aaggcgagtt acatgatccc 2940
ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctctcc gatcgttgc agaagtaagt 3000
tgcccgaggt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc 3060
catocgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatacc 3120
gcgcggcgcg accgagttgc tcttgcggcg cgtcaatacg ggataatagt gtatgacata 3180
gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc gggcgaaaaa ctctcaagga 3240
tcttaccgct gttgagatcc agttcgtagt aaccactcg tgcacccaac tgatcttcag 3300
catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgcggcaa 3360
aaaagggaat aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actcttctt tttcaatatt 3420
attgaagcat tcatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga 3480
aaaaataaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag 3540
aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaatagggc tatcacgagg ccttctcgtc 3600

```

10

20

30

40

```

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 3660
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 3720
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cgccatcaga gcagattgta ctga 3774

```

<210> 10

<211> 5148

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGN39

<400> 10

```

taatacgaact cactataggg cgaattcaaa aaacccctca agaccggttt agaggcccca 60
aggggttatg ctagtgaatt ctgcagcggg acccggggat cctctagaga tccctcgacc 120
tcgagatcca ttgtgctgga aagatcacia gtttgtacaa aaaagctgaa cgagaaacgt 180
aaaatgatat aaatatcaat atattaaatt agattttgca taaaaaacag actacataat 240
actgtaaaac acaacatatc cagtcactat ggccggccga ttaggcacc caggctttac 300
actttatgct tccggctcgt ataattgtgt gattttgagt taggatccgg cgagattttc 360
aggagctaag gaagctaaaa tggagaaaaa aatcactgga tataccaccg ttgatataat 420
ccaatggcat cgtaaagaac attttgaggc atttcagtc gttgtcaat gtacctataa 480
ccagaccgtt cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcacia 540
gctttatccg gcttttattc acattcttgc ccgctgatg aatgctcatc cggaattccg 600
tatggcaatg aaagacgggt agctgggtgat atgggatagt gttcaccctt gttacaccgt 660
tttccatgag caaactgaaa cgttttcatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg 720
gcagtttcta cacatatatt cgcaagatgt ggcggtgtac ggtgaaaacc tggcctatct 780
ccctaagggt tttattgaga atattgtttt cgtctcagcc aatccctggg tgaatttcc 840
cagttttgat ttaaacgtgg ccaatatgga caactcttc gcccccggtt tcaccatggg 900
caaataattat acgaaggcg acaagggtgt gatgccgtg gcgattcagg ttcactatgc 960
cgtctgtgat gggttccatg toggcagaat gcttaaatga ttacaacagt actgcgatga 1020
gtggcagggc gggcgtaaaa gatctggatc cggcttacta aaagccagat aacagtatgc 1080
gtatttgcgc gctgattttt gcggtataag aatatatact gatagtata cccgaagtat 1140
gtcaaaaaga ggtgtgctat gaagcagcgt attacagtga cagttgacag cgacagctat 1200
cagttgctca aggcataatat gatgtcaata tctccggtct ggtaagcaca accatgcaga 1260
atgaagcccg tctctgctgt gccgaacgct ggaaagcgga aaatcaggaa gggatggctg 1320
aggtcgcccg gtttattgaa atgaacgggt cttttgctga cgagaacagg gactggtgaa 1380
atgcagttta aggtttacac ctataaaaga gagagccgtt atcgtctgtt tgtggatgta 1440
cagagtata ttattgacac gcccgggcga cggatggtga tccccctggc cagtgcacgt 1500
ctgctgtcag ataaagtctc ccgtgaactt taccgggtgg tgcataatcg ggatgaaagc 1560
tggcgcatga tgaccaccga tatggccagt gtgcgggtct ccgttatcgg ggaagaagtg 1620
gctgatctca gccaccgcga aaatgaocat aaaaacgcca ttaacctgat gttctgggga 1680
atataaatgt caggctccct tatacacagc cagctcgag gtcgaccata gtgactggat 1740
atgttgtgtt ttacagtatt atgtagtctg ttttttatgc aaaatcta ttaatatatt 1800
gataattata tcattttacg tttctcgttc agctttcttg tacaagtggt tgatctttcc 1860
agcacaatgg atctcgaggg atcttccata cctaccagtt ctgcgcctgc aggtcgccgc 1920
cgcgactcta gacgcgtaag ctactagca taaccccttg gggcctctaa acgggtcttg 1980
aggggttttt tgagcttctc gccttatagt gagtcgtatt acagcttgag tattctatag 2040
tgtcacctaa atagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 2100
ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgc 2160
taatgagtga gtaactcac attaattgag ttgcgctcac tgcgcgttt ccagtcggga 2220
aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgag cggggagagg cggtttgctg 2280
attgggctgt cttccgcttc ctgcctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 2340
cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac 2400
gcaggaaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgag 2460
ttgctggcgt ttttcgatag gctccgcccc cctgacgagc atcaaaaaa tcgacgctca 2520
agtcaagggt ggccgaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccttggaagc 2580
tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 2640
ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 2700
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgca gaaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 2760
ttatccggtg actatcgtct tgagccaac ccggtaaagc acgacttata gccactggca 2820
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg 2880

```

10

20

30

40

```

aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg 2940
aagccagttta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaaca aaccaccgct 3000
ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattaocg gcagaaaaaa aggatctcaa 3060
gaagatcctt tgatcctttc tacgggtctc gaogctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 3120
gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3180
tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct ggtctgacag ttaccaatgc 3240
ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtotatttc gttcatccat agttgctga 3300
ctccccgtcg ttagataacg tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca 3360
atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 3420
ggaagggcgg agcgcagaag tggctcctgca actttatccg cctccatcca gtctatlaat 3480
tggtgcccgg aagctagagt aagtagttcg ccagtttaata gtttgcgcaa cgttgttggc 3540
attgctacag gcacgtgggt gtcacgctcg togtttggta tggcttcatt cagctccggt 3600
tcccaacgat caaggcagtg tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc 3660
ttcggctctc cgtatcgttg cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg 3720
gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt 3780
gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatac cgcgcgccgc gaccgagttg ctcttgccc 3840
cggtcaatac gggataatag tgtatgacat agcagaactt taaaagtgtc catcattgga 3900
aaacgtttct cgggcgcaaa actctcaagg atcttacccg tgttgagatc cagttcgatg 3960
taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcacttttta ctttaccag cgtttctggg 4020
tgagcaaaaa cagggaaggca aaatgccgca aaaaaggga taagggcgac acggaatgt 4080
tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc 4140
atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaatagggtg tccgcgcaca 4200
tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat 4260
aaaaataggg gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt tcggtgatga cggtgaaaac 4320
ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc 4380
agacaagccc gtcaggggcg gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat 4440
cgggcatcag agcagattgt actgagagt caccatattg ggtgtgaaat accgcacaga 4500
tgcgtaaggga gaaaataccg catcaggcga aattgtaaac gttaatattt tgttaaaatt 4560
cgcgtaaat atttgttaaa tcagctcatt ttttaaccaa taggcgaaa tcggcaaaat 4620
ccottataaa tcaaaagaat agaccgagat aggggttagt gttgttccag tttggaacaa 4680
gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg 4740
cgatggccca ctacgtgaac catcacccaa atcaagtttt ttgcggtcga ggtgccgtaa 4800
agctctaat cggaacccta aaggagagcc cagatttaga gcttgacggg gaaagccggc 4860
gaacgtggcg agaaaagga ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag 4920
tgtagcggtc acgtgcgcg taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg 4980
cgcgtccatt cgcatttcag gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcggg gcgggcctct 5040
tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg 5100
ccaggggttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattg 5148

```

<210> 11
 <211> 3715
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Plasmid
 TopoRNAi

```

<400> 11
gagtgaccca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcgaaattg taaacgttaa tattttggtt aaattcgcgt taaatatttg ttaaatcagc 120
tcatttttta accaataggg cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 180
gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
tccaacgtca aaggcgaaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg tgaacctaca 300
cccaaatcaa gttttttgcg gtogaggtgc cgtaaaagtc taaatcgga coctaaaggg 360
agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaac tggcgagaaa ggaagggaag 420
aaagcgaaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 480
accacaccgg ccgcgcttaa tgcgcgctta cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc 540
gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag 600
gggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag toacgacgtt 660
gtaaaacgac ggccagtga ttgtaatacg actcactata gggcgaaattc aaaaaacccc 720

```

10

20

30

40

```

tcaagaccg tttagaggcc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaaccgggg 780
atcctctaga gatccctcga cctcgagatc cattgtgggt gaattctacc aaggctagca 840
tgggcagccg aatacagtga tccgtgcogg ccctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga 900
cggctctgacg acacgcaaac tggcggaacg gttgggggtg cagcagccgg cgctttactg 960
gcacttcagg aacaagcggg cgctgctcga cgactggcc gaagccatgc tggcggagaa 1020
tcatacgctt cgggtgcgag agccgaogac gactggcgct ctttctgat cggaatccc 1080
gcagccatgc tagccttggt agaattccac cacaatggat ctcgagggat cttccatacc 1140
taccagttct ggcctgcag gtccggccg cgactctcta gacgcgtaag cttactagca 1200
taaccccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgagcttctc gccctatagt 1260
gagtcgtatt acagcttgag tatctatag tgcacctaa atagcttggc gtaatcatgg 1320
tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc 1380
ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gtaactcac attaatgctg 1440
ttgcgctcac tgcccgtttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc 1500
ggccaacgcg cggggagagg cgggttgctg attggggcgt cttccgcttc ctcgctcact 1560
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcgggat cagctcactc aaaggcgcta 1620
atacgggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaga acatgtgagc aaaaggccag 1680
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcy ttgctggcgt ttttcgatag gctccgcccc 1740
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 1800
taaagatacc aggcgtttcc ccttggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg 1860
ccgcttaccg gatacctgtc cgctttctc ccttcgggaa cgttgccgtt ttctcatagc 1920
tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 1980
gaacccccgc ttaccccgca ccgctgcgcc ttatccgcta actatcgtct tgagtccaac 2040
ccgtaagac acgacttatc gcoactgca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 2100
aggatgttag cgggtgctac agagttcttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga 2160
aggacagtat ttggtatctg cgtctcgtg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt 2220
agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag 2280
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct 2340
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg 2400
atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat 2460
gagtaaaact ggctcagacg ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc 2520
tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctcccgtcg ttagataaac tacgatacgg 2580
gagggtctac catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagaccacg ctacccggtc 2640
ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca 2700
actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 2760
ccagttaata gtttcgcaaa cgttggtggc attgctacag gcacgtgggt gtcacgctcg 2820
tcgtttggtt tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 2880
cccattgtgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag 2940
ttggcgcgag tggtatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 3000
ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatac 3060
cgcgcccgcc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatag tgtatgacat 3120
agcagaactt taaaagtgtc catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 3180
atcttaccgc tggtgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca 3240
gcacctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 3300
aaaaagggaa taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat 3360
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acataattga atgtatttag 3420
aaaaataaac aaatagggtt tcgcgcgaca tttcccgaa aagtgcacc tgacgtctaa 3480
gaaaccatta ttatcatgac attaaactat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 3540
ctcgcgctgt tcgggtgatg cgtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc 3600
acagcttgct tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt 3660
gttggcgggt gtcggggcgt gcttaactat gcgcacatc agcagattgt actga 3715

```

<210> 12

<211> 4107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGN49A

<400> 12

tgtaatacga ctactatag ggcaattca aaaaaccct caagaccgt ttagaggccc 60

10

20

30

40

caaggggtta tgctagttaa ttctgcagcg gtacccgggg atcctctaga gatccctcga 120
 cctcgagatc catttgtctg gaaaggatct ggatccggct tactaaaagc cagataacag 180
 tatgctgatt tgccgcgtga tttttgcggt ataagaatat atactgatat gtataccoga 240
 agtatgtcaa aaagagggtg gctatgaagc agcgtattac agtgacagtt gacagcgaca 300
 gctatcagtt gctcaaggca tatatgatgt caatatctcc ggtctggtaa gcacaacat 360
 gcagaatgaa gcccgctcgc tgcgtgcoga acgctggaaa gcggaaaatc aggaagggat 420
 ggctgaggtc gcccggttta ttgaaatgaa cggctctttt gctgacgaga acagggactg 480
 gtgaaatgca gtttaagggt tacacctata aaagagagag cgttatcgt ctgtttgtgg 540
 atgtacagag tgatattatt gacacgcccg ggcgacggat ggtgatcccc ctggccagt 600
 cacgtctctt aagcgataaa gtctcccggt aactttaccc ggtggtgcat atcggggatg 660
 aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc ggtctccgtt atcggggaag 720
 aagtggctga totcagccac cgcgaaaatg acatcaaaaa cggcattaac ctgatgttct 780
 ggggaatata aatgtcagcg tcccttatac acagcctttc cagcacaatg gatctcgagg 840
 gatcttccat acctaccagt tctgcgctg caggtcgcg ccgcgactct agacgcgtaa 900
 gcttactagc ataacccctt ggggcctcta aacgggtctt gagggggttt ttgagcttct 960
 cgccctatag tgagtcgtat tacagcttga gtattctata gtgtcaccta aatagcttgg 1020
 cgtaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 1080
 acatagcggt caggaagcata aagtgtaaag cctggggtgc ctaatgagtg agctaactca 1140
 cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtggg aaacctgtcg tgccagctgc 1200
 ataatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggggcg tcttccgctt 1260
 cctcgctcac tgaactcgtg cgtcgggtcg ttcggtcgcg gcgagcggt tcaagctcat 1320
 caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 1380
 caaaagggta gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttcgata 1440
 ggctccgccc cctgacgag catcacaata atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc 1500
 cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 1560
 ttccgacctt gccgcttacc ggatacctgt ccgctcttct ccttccggga agcgtggcg 1620
 tttctcatag ctacagctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg 1680
 gctgtgtgca gcaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatctc 1740
 ttgagtccaa cccggtaga cagacttat cgcactggc agcagccact ggtaacagga 1800
 ttagcagagc gaggatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtag cctaactacg 1860
 gctacataga aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcgga 1920
 aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaaccg ttgtagcggg ggtttttttg 1980
 tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 2040
 ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaa actcagctta agggattttg gtcatgagat 2100
 tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagttt aatcaatct 2160
 aaagtatata tgagtaaaat tggctctgca gttaccaaag cttaatcagt gaggcaccta 2220
 totcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg actcccgctc gtgtagataa 2280
 ctacgatacg ggagggtcta ccatctggcc ccagtctgc aatgataccg cgagaccac 2340
 gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaaggcc gagcgagaa 2400
 gtggctctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag 2460
 taagtagttc gccagttatc agtttgcgca acgtttgtg cattgctaca ggcactgtg 2520
 tgtcacgctc gtcgttttgt atggttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag 2580
 ttacatgato ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct ccgatcgtt 2640
 tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 2700
 ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactoa accaagtcac 2760
 totgagaata ccgcgcccg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 2820
 gtgtatgaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 2880
 aactctcaag gatcttacgg ctgttgagat ccagtctgat gtaaccact gtgagcaaaa 2940
 actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 3000
 aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca caccgaaatg ttgaatactc atactcttcc 3060
 tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 3120
 aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 3180
 ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaacct taaaaatagg cgtatcacga 3240
 ggccctttcg tctcgcgctg ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 3300
 cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg atgcccggag cagacaagcc cgtcaggcg 3360
 cgtcagcggg tgtggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 3420
 tactgagagt gccacatatg cgggtgtgaa taccgcacag atgcgttaag agaaaatacc 3480
 gcactgagcg aaattgtaaa cgttaatat tttgttaaa tccggttaa tttttgttaa 3540
 atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcgcaaaaa tcccttataa atcaaaagaa 3600
 tagacggaga taggggttag tgtgttcca gtttggaaac agagtccact attaaagaac 3660
 gtggactcca acgtcaaaag gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa 3720

10

20

30

40

```

ccatcaccca aatcaagttt tttgcggtcg aggtgccgta aagctctaaa tcggaaccct 3780
aaagggagcc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa 3840
gggaagaaag cgaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggc cacgctgcgc 3900
gtaaccacca caccgcgcgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtccat tcgccattca 3960
ggctgogcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttogctatta cgccagctgg 4020
cgaagggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccaggggtt tcccagtcac 4080
gacgttgtaa aacgacggcc agtgaat 4107

```

<210> 13

<211> 4001

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Plasmid pGN59A

10

<400> 13

```

gagtgaccca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcgaatttg taaacgttaa tatattgtta aaattcgcgt taaatatattg ttaaatcagc 120
tcatttttta accaataggg cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 180
gagatagggt tgagtgttgt tcagttttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 300
cccaaatcaa gtitttttgcg gtcgaggtgc cgtaaaagctc taaatcggaa ccctaaaggc 360
agccccgat tttagagcttg acggggaaaag ccggcgaaac tggcgagaaa ggaaggggaa 420
aaagcgaaag gagcggggcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 480
accacaccgc ccgcgcttaa tgcgcgcgta cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc 540
gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaaag 600
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagtggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt 660
gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtaatacg actcactata gggcgaaatc gagctcggta 720
cccggggatc ctctagagat ccctcgacct cgagatccat tgtgctggaa aggatctgga 780
tccggcttac taaaagccag ataacagtat gcgtatttgc gcgctgattt ttgcggtata 840
agaatatata ctgatatgta taccogaagt atgtcaaaaa gaggtgtgct atgaagcagc 900
gtattacagt gacagttgac atcagttgct caaggcatat atgatgtcaa 960
tatctccggt ctggtgaagc caaccatgca gaatgaagcc cgtcgtctgc gtgccgaacg 1020
ctggaagcgc gaaaatcagg aagggatggc tgaggtcgcc cggtttattg aaatgaacgg 1080
ctcttttgcg gacgagaaca gggactggtg aaatgcagtt taaggtttac acctataaaa 1140
gagagagccg ttatcgtctg tttgtggatg tacagagtga tattattgac acgcccgggc 1200
gacggatggt gatccccctg gccagtgcaac gtctcttaag cgataaagtc tcccgtgaac 1260
tttaccgcgt ggtgcatatc ggggatgaaa gctggcgcat gatgaccacc gatattggcca 1320
gtgtgcgggt ctccggttatc ggggaagaag tggtgatctc cagccaccgc gaaaatgaca 1380
tcaaaaacgc cattaacctg atgttctggg gaataataat gtcaggctcc cttatacaca 1440
gcctttccag cacaatggat ctcgagggat cttccatacc taccagttct gcgcctgcag 1500
gtcgcggccg cgactctcta gactcgaaag cttctcgccc tatagtgagt cgtattacag 1560
cttgagtatt ctatagtgtc acctaaatag cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc 1620
tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt 1680
taaaagcctg ggtgcctaata gactgagcta actcacatta attgcgttgc gtcactgcc 1740
cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgoggg 1800
gagagggcgt ttgogtattg ggcgctcttc cgttccctog ctcaactgact cgtgcgctc 1860
ggtcgttcgc ctgcggcgag cggatcagc tcactcaaa ggcgtaatac ggttatccac 1920
agaatcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggcagga 1980
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt cgataggctc cggcccccctg acgagcatca 2040
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 2100
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccc ttaccggata 2160
cctgtccgoc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 2220
tctcagttog gtgtaggtag ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca 2280
gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga 2340
cttatcgcca ctggcagcag ccaactgtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcgg 2400
tgctacagag ttcttgaaat ggtggcctaa ctacgctac actagaagga cagtatttgg 2460
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 2520
caaacaaaac accgctggta gcggtgggtt tttgttttgc aagcagcaga ttacgcgcag 2580
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtgga 2640

```

20

30

40

```

cgaaaactca cgtaagga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 2700
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatattgagt aaacttgggc 2760
tgacagttac caatgcttaa tcagtggagc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 2820
atccatagtt gcttgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 2880
tggtccagct gctgcaatga taccgggaga cccacgctca cgggctccag atttatcagc 2940
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 3000
catccagctc attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3060
gcgcaacggt gttggcattg ctacaggcat cgtgggtgca cgtcgtcgtt ttgggtatggc 3120
ttcattcagc tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tggtgtgcaa 3180
aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgcaga agtaagttgg ccgcagtgtt 3240
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgccat ccgtaagatg 3300
cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaataccgcg cccggcgacc 3360
gagttgctct tgcccgcggt caatacggga taatagtgtg tgacatagca gaactttaa 3420
agtgtcatc attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 3480
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tottcagcat cttttacttt 3540
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag 3600
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcactat cttccttttt caatatattt gaagcattta 3660
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 3720
aggggttcgg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 3780
catgacatta acctataaaa ataggcgtat caccaggccc ttctcgtctc cgcgtttcgg 3840
tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca gtcgccggag acgggtcacag cttgtctgta 3900
agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgta cggggtgttg gcgggtgtcg 3960
gggctggctt aactatgagg catcagagca gattgtactg a 4001

```

<210> 14
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN103

<400> 14
 taccaaggct agcatgggtt atcactgata agttgg 36

<210> 15
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN104

<400> 15
 taccaaggct agcatggggc tgcctgaagg ctgc 34

<210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN126

<400> 16
 gatctggatc cggttacta aaagccagat aacagtatgc 40

<210> 17

10

20

30

40

<211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN127

<400> 17
 ggagacttta tcgttaaga gacgtgcact ggccaggggg atcacc 46

<210> 18
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN128

<400> 18
 ccagtgcacg tctcttaagc gataaagtct cccgtgaact ttaccgcgtg g 51

<210> 19
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide oGN129

20

<400> 19
 gctgtgtata agggagcctg acatttatat tccccag 37

<210> 20
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR fragment
 generated by primers oGN103 and oGN104 on pCDM8

<400> 20
 taccaaggct agcatgggtt atcactgata agttggataa gttgggtggc atattatgtt 60
 tatcagtgat aaagtgtcaa gcatgacaaa gttgcagccg aatacagtga tccgtgcogg 120
 ccttgactg ttgaacgagg tcggcgtaga cggctgcagc acacgcaaac tggcggaacg 180
 gttgggggtg cagcagccgg cgttttactg gcacttcagg aacaagcggg cgctgctcga 240
 cgcactggcc gaagccatgc tggcggagaa tcatacgtt cgggtccgag agccgacgac 300
 gactggcgtc catttctgat cgggaatccc gcagcttcag gcaggcccat gctagccttg 360
 gtaccagcac aatgg 375

30

<210> 21
 <211> 670
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

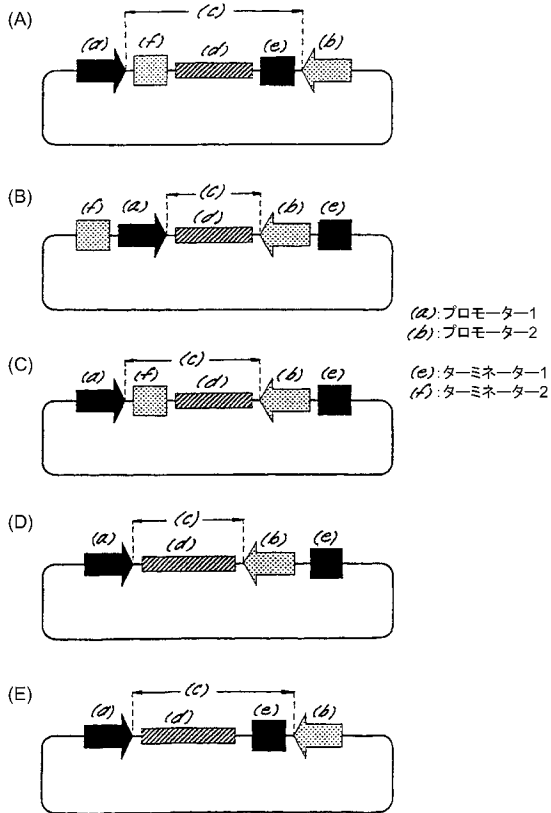
<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR fragment

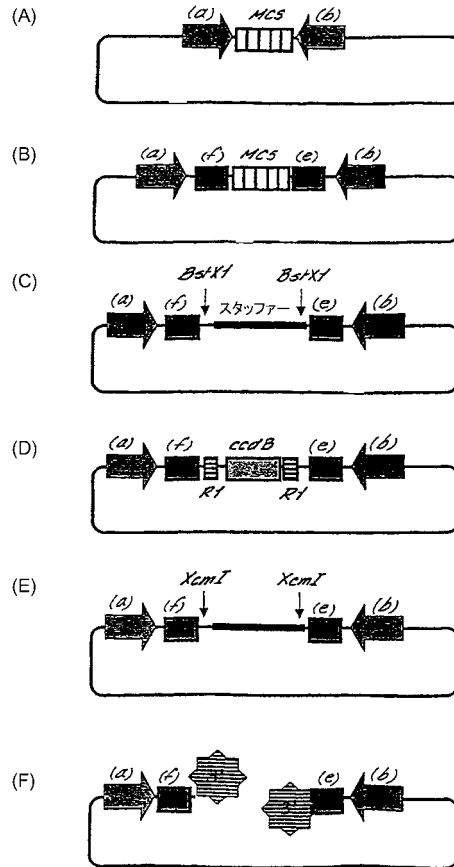
40

<400> 21
 gatctggatc cggcttacta aaagccagat aacagtatgc gtatttgccg gctgattttt 60
 gcggtataag aatatatact gatatgtata ccgaagtat gtcaaaaaga ggtgtgctat 120
 gaagcagcgt attacagtga cagttgacag cgacagctat cagttgtca aggcataatat 180
 gatgtcaata tctccggtct ggtaagcaca accatgcaga atgaagcccg tcgtotgcgt 240
 gccgaacgct ggaagcgga aaatcaggaa gggatggctg aggtcgcccg gtttattgaa 300
 atgaacggct cttttgctga cgagaacagg gactggtgaa atgcagtta aggtttacac 360
 ctataaaaaga gagagccgtt atcgtctgtt tgtggatgta cagagtata ttattgacac 420
 gcccgggcga cggatggtga tccccctggc cagtgcacgt ctcttaagcg ataaagtctc 480
 ccgtgaactt taaccgggtg tgcataatcg ggatgaaagc tggcgcatga tgaccaccga 540
 tatggccagt gtgcgggtct cgtttatcgg ggaagaagtg gctgatctca gccaccgcga 600
 aaatgacatc aaaaacgcca ttaacctgat gttctgggga atataaatgt caggctccct 660
 tatacacagc 670

【図 1】

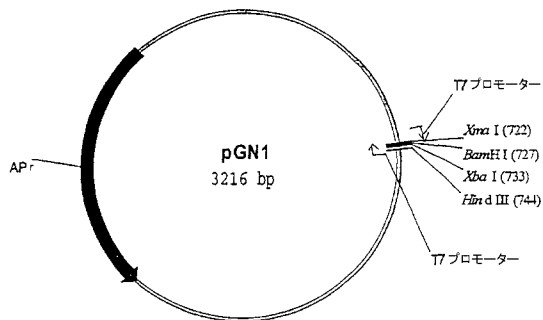


【図 2】



【図 3】

T7ターミネーターとのRNAiベクターの構築



【図 4】

T7ターミネーターとのRNAiベクターの構築

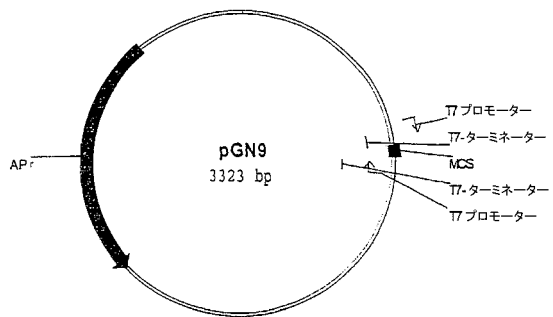


Fig. 5.

【 5 】

611
T7p
TGTAAATAG ACTCACTAA
AACATTAAC TGAATAT
701 GGGGAAATC GAGCTGGTA CCGGGATC CTCGATGC GAGAGCTCT GAGCTTAG TGAATAT
CCGCTTAG CTGAGCAT GAGCCTAG GAGATCTAG CTTGAGAA GGGGATC ACTGAGTA
771 TACAGCTGA GTATCTATA GTGACCTA AATAGCTAG GTATATCT GTATATCT
ATGCGACT CTAAGATAT CAGATGAT TATCGAAC GTATATAG CAGATGAC AAGGACCA

【 7 】

EcoRI com. EcoRI PstI KpnI
T7 ターミナル
5' AATTCAAAACCCCTCAAGACCGTTTAGAGCCCAAGGGTTATGCTAGTGAATCTGACGGGTAC 3'
3' GTTTTTGGGGAGTTCTGGGCAATCTCCGGGGTTCCCAATAGATCACTTAAGAGCTGC 5'
T7 ターミナル
XbaI MluI HindIII
5' CTAGACCGGTAGCTTACTAGCATACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGCTTAGGGGTTTTTG 3'
3' TGGCGATTGGAATGATCGATATTGGGACCCCGGAGATTGGCCAGAACTCCCAAAACTCGA 5'

Fig. 8.

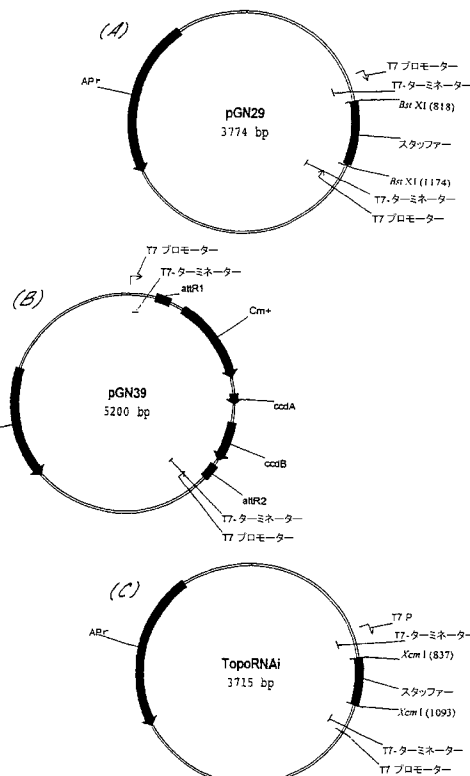
【 8 】

611
T7p
TGTAAATAG ACTCACTAA
AACATTAAC TGAATAT
701 GGGGAAATC GAGCTGGTA CCGGGATC CTCGATGC GAGAGCTCT GAGCTTAG TGAATAT
CCGCTTAG CTGAGCAT GAGCCTAG GAGATCTAG CTTGAGAA GGGGATC ACTGAGTA
771 TACAGCTGA GTATCTATA GTGACCTA AATAGCTAG GTATATCT GTATATCT
ATGCGACT CTAAGATAT CAGATGAT TATCGAAC GTATATAG CAGATGAC AAGGACCA
841 GGGTATTG AGCTCTGC GTATATAG GTGATATC AGCTATAG TGTATATG TACATTAAT
CCCAAAAC TGAAGAG GATATCAT CAGATATG TGAATATG AAGATATG ATGATATG

【 6 】

T7 ターミナル
ACTAGCATACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGCTTAGGGGTTTTTG
TGTATGATTGGGGAAACCCCGGAGATTGGCCAGAACTCCCAAAAC

【図 9】



【図 11】

FIG. 11.

pGN29

1 gaggtaacaa tatcggtgtt gaataacgc acagatggtt aaggagaanaa tacocgatca
 61 ggagaaattg taacagttaa tatattttta aaattcgggt taattatttg ttaaatcgc
 121 tcaattttttt acaatagcga cgaatcggtt aaattccctt ataatcaaa agaatagacc
 181 gaggataggt tgaattgtgt tcaatttttg acaaatagct caattataaa gaactggacc
 241 tccaacttca aaggcggaaa aacgtgttat caggcggtgt gccactacgt tgaactatca
 301 occaactcaa gttttttgcg tgcagaggtg cgttaagctt taactcgaaa ggaaggaagg
 361 agcccccgat tttagctgtt acgggggaag cggcgacat ttgcggaaa ggaaggaagg
 421 aaagcgaagg gagcggtgag tagggcgctg cgaagttag cgttcacgt cgcgttaagg
 481 accacacccc cggcggttaa tgcgcgctga caggcggtgt ccaatcgcca ttacaggtgc
 541 gcaactgtgt ggaaggcgga tgcgttcggt cctcttcgct attacgacg ctggcgaaag
 601 ggggtatgtc tgaaggga ttaagtgtgg taacggcggt gttttccag tcaacagctt
 661 gtaaaacgac ggcagtgtaa ttgtaaacg actcaataa gggcgatcc aaaaacccc
 721 tcaagacccc tttagagccg ccaagggttt atgtcagta atctcgaa gtaccgggg
 781 atctctaga cgtgttgtt cctcttcgct cctatagta gtctagtaa agcttgatg
 841 atagtttgtt ggaactatg ttgtttatc ttgaatagc tcaagatga caaagtgtga
 901 ggcgaataca ggtgttcctg cggcgctggt actgtttaa gaggctgtg tagaggtgt
 961 gaagacacg aaactcggtg aacgtgttgg gttgcagcag cggcggttt actgcaact
 1021 caggaaacag cggcgctgct tgaacgact ggcgaagcc atgtcggtg agaatatcc
 1081 cgttggtgtt cggagcgcca cgaacagctg cgtctatct ttgatggaa tcccgagct
 1141 tcaggagggc gctgtcgcg taacggcagc acaatggatc ttggaggtc ttccatcct
 1201 aacagttctg cgtctcagc tgcggcgccg gactctatg aacgttaagc ttactagat
 1261 aaccccttgg ggcctcaaaa cgggtttttt ggggtttttt gaggcttcgt ccttatagc
 1321 actgtatata cagtttgtgt attctatagt gtacactaaa tagtttggg taatctgtt
 1381 catagtgttt tctgtgtgta atgttttct cgtccacaa ttcaacacac atacagcgcc
 1441 gaagcataaa gtttaaacg ttgggtgctt actgaatgag actactcaaa ttatgttgt
 1501 ttgggtcact gccccttttc cagtgggaa actgtgtgtg cgaatgcat taatgaatg
 1561 gccacagcgc ggggagggcg gtttgtgta ttggggctc ttccgtcttc tgcgtcaact
 1621 actcgtctgc cgtgttgtt cgtgtcgtg gagcgtgac actactcaaa aagggttaa
 1681 taccgtttac caagaaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgaca aagcgacg
 1741 aaagggcccg gaacgttaa aaggcgctgt tctgtgctt ttgatagc ctcgcctcc
 1801 tcagcagca tcaaaaatc cagcgtcaa cgcagaggtg gcgaacccg acagagatc
 1861 aaagatacca ggcgtttccc cgtgaagctt cctctgtgct cctctgtgt cgcgaaccc
 1921 cgttaccggt atactcgtc tctgtgtggt ttgtgtggt caagtggtt tccatcgtt
 1981 cagctgtgat gtatctcgt tctgtgtggt ttgtgtggt caagtggtt tccatcgtt
 2041 aaccccgctg tcaagcagca cgtctcgtt tatctgtgat atactcgtt tccatcgtt
 2101 cgttaagaa cgtctatgc cactcgtgag cagcactgtg taacagatc apagagcgga
 2161 ggtatgttag cgtgtcaca gactcttga atgtgtggt taactacgc tacactaga
 2221 ggaactatc tggatctcgc gctgtcgtga agcagtgat cttcgaaa aaggttgtt
 2281 gctctgtatc cggaaacaa acccccgctg gtacggtgtg tttttttt tgcagagc
 2341 agattacgag cagaaaaaaa ggaatcctaa aagatccttt gactctttt acgggtctg
 2401 acgtcagtg gaaagaaac tcaagtaag ggaatttgtt catagatga tcaaaagga
 2461 tcttcaacta gatctttta atttaaaaaa gaagtttaa atcaactaa agtatatgt
 2521 agtaaacgtg tctgcagatc taactcagta ggaactatc tcaagatgt
 2581 gtatattgt ttatcacta gttcgtcag tcccgctgt gtagataat acgataggg
 2641 agggatcag atctgtccc atgtgtcaa tgaacccg agacccggt tcaacggtc
 2701 caagttatc acataaac cagcagcagc gaggcgga ggcgaaggt ggtcctgca
 2761 cttatcgcg ctcactcag tctattatc ttgtcgggga agtagagta agtagtcgc
 2821 actgtaaatg ttgtgcaac gttgttgaca ttgttcagc catctgtgt tcaacgtgt
 2881 cgtttgtat ggttactc cgtcctgtt ccaacagat aaggcggtt acatgctcc
 2941 cactgttgt caaaaaagc gttactcct tgcgtctcc gatctgtg agaataggt
 3001 tggcgcaggt gttatcact cgtgtgtgt agtactcag caatctctt agtagtcgc
 3061 catcogtaag atgttttct gttcgtgtg agtactcag caatctctt agtagtcgc
 3121 ggcgcgcg cagcgtgtg tcttcggcg ggtcaatag ggaataatgt gtagacata
 3181 gogaactctt aaagtgctc atcatcgaa aagttcttc gggcgaaa cttccagga
 3241 tttacagcgt gttgagacc atgttgtgt aaacacatg tgaacttga gtttttga
 3301 catctttac ttccacagc gttctgtgt ggcgaacaa aggaagcaa aatgcgcga
 3361 aaagggatc aaggcgca cggaaaggtt gaactcct actctctt tctcaatt
 3421 atgaagcat ttatcaggt ttatgctca ttgagagta catatttga gtttttga
 3481 aaataaaca atagaggtt cgcgcacat ttccgaaa agtcacatc gactgttag
 3541 aaacatatt tatcatgca ttaactata aaataggg tacaaggg cctctgtgt
 3601 tgcgcgttt cgtgtatgc ggtgaaac tctcagcat gactcggg gagggtgca
 3661 cagatgtc gtagagcat gctgtgaga gacaagccc tggcggtg cagcggtgt
 3721 ttgggggtg tgggggtg ctttaactg agcatcaga ggaatttga ctga

【図 10】

FIG. 10.

pGN9

1 gaggtaacaa tatcggtgtt gaataacgc acagatggtt aaggagaanaa tacocgatca
 61 ggagaaattg taacagttaa tatattttta aaattcgggt taattatttg ttaaatcgc
 121 tcaattttttt acaatagcga cgaatcggtt aaattccctt ataatcaaa agaatagacc
 181 gaggataggt tgaattgtgt tcaatttttg acaaatagct caattataaa gaactggacc
 241 tccaacttca aaggcggaaa aacgtgttat caggcggtgt gccactacgt tgaactatca
 301 occaactcaa gttttttgcg tgcagaggtg cgttaagctt taactcgaaa ggaaggaagg
 361 agcccccgat tttagctgtt acgggggaag cggcgacat ttgcggaaa ggaaggaagg
 421 aaagcgaagg gagcggtgag tagggcgctg cgaagttag cgttcacgt cgcgttaagg
 481 accacacccc cggcggttaa tgcgcgctga caggcggtgt ccaatcgcca ttacaggtgc
 541 gcaactgtgt ggaaggcgga tgcgttcggt cctcttcgct attacgacg ctggcgaaag
 601 ggggtatgtc tgaaggga ttaagtgtgg taacggcggt gttttccag tcaacagctt
 661 gtaaaacgac ggcagtgtaa ttgtaaacg actcaataa gggcgatcc aaaaacccc
 721 tcaagacccc tttagagccg ccaagggttt atgtcagta atctcgaa gtaccgggg
 781 atctctaga cgtgttgtt cctcttcgct cctatagta gtctagtaa agcttgatg
 841 atagtttgtt ggaactatg ttgtttatc ttgaatagc tcaagatga caaagtgtga
 901 ggcgaataca ggtgttcctg cggcgctggt actgtttaa gaggctgtg tagaggtgt
 961 gaagacacg aaactcggtg aacgtgttgg gttgcagcag cggcggttt actgcaact
 1021 caggaaacag cggcgctgct tgaacgact ggcgaagcc atgtcggtg agaatatcc
 1081 cgttggtgtt cggagcgcca cgaacagctg cgtctatct ttgatggaa tcccgagct
 1141 tcaggagggc gctgtcgcg taacggcagc acaatggatc ttggaggtc ttccatcct
 1201 aacagttctg cgtctcagc tgcggcgccg gactctatg aacgttaagc ttactagat
 1261 aaccccttgg ggcctcaaaa cgggtttttt ggggtttttt gaggcttcgt ccttatagc
 1321 actgtatata cagtttgtgt attctatagt gtacactaaa tagtttggg taatctgtt
 1381 catagtgttt tctgtgtgta atgttttct cgtccacaa ttcaacacac atacagcgcc
 1441 gaagcataaa gtttaaacg ttgggtgctt actgaatgag actactcaaa ttatgttgt
 1501 ttgggtcact gccccttttc cagtgggaa actgtgtgtg cgaatgcat taatgaatg
 1561 gccacagcgc ggggagggcg gtttgtgta ttggggctc ttccgtcttc tgcgtcaact
 1621 actcgtctgc cgtgttgtt cgtgtcgtg gagcgtgac actactcaaa aagggttaa
 1681 taccgtttac caagaaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgaca aagcgacg
 1741 aaagggcccg gaacgttaa aaggcgctgt tctgtgctt ttgatagc ctcgcctcc
 1801 tcagcagca tcaaaaatc cagcgtcaa cgcagaggtg gcgaacccg acagagatc
 1861 aaagatacca ggcgtttccc cgtgaagctt cctctgtgct cctctgtgt cgcgaaccc
 1921 cgttaccggt atactcgtc tctgtgtggt ttgtgtggt caagtggtt tccatcgtt
 1981 cagctgtgat gtatctcgt tctgtgtggt ttgtgtggt caagtggtt tccatcgtt
 2041 aaccccgctg tcaagcagca cgtctcgtt tatctgtgat atactcgtt tccatcgtt
 2101 cgttaagaa cgtctatgc cactcgtgag cagcactgtg taacagatc apagagcgga
 2161 ggtatgttag cgtgtcaca gactcttga atgtgtggt taactacgc tacactaga
 2221 ggaactatc tggatctcgc gctgtcgtga agcagtgat cttcgaaa aaggttgtt
 2281 gctctgtatc cggaaacaa acccccgctg gtacggtgtg tttttttt tgcagagc
 2341 agattacgag cagaaaaaaa ggaatcctaa aagatccttt gactctttt acgggtctg
 2401 acgtcagtg gaaagaaac tcaagtaag ggaatttgtt catagatga tcaaaagga
 2461 tcttcaacta gatctttta atttaaaaaa gaagtttaa atcaactaa agtatatgt
 2521 agtaaacgtg tctgcagatc taactcagta ggaactatc tcaagatgt
 2581 gtatattgt ttatcacta gttcgtcag tcccgctgt gtagataat acgataggg
 2641 agggatcag atctgtccc atgtgtcaa tgaacccg agacccggt tcaacggtc
 2701 caagttatc acataaac cagcagcagc gaggcgga ggcgaaggt ggtcctgca
 2761 cttatcgcg ctcactcag tctattatc ttgtcgggga agtagagta agtagtcgc
 2821 actgtaaatg ttgtgcaac gttgttgaca ttgttcagc catctgtgt tcaacgtgt
 2881 cgtttgtat ggttactc cgtcctgtt ccaacagat aaggcggtt acatgctcc
 2941 cactgttgt caaaaaagc gttactcct tgcgtctcc gatctgtg agaataggt
 3001 tggcgcaggt gttatcact cgtgtgtgt agtactcag caatctctt agtagtcgc
 3061 catcogtaag atgttttct gttcgtgtg agtactcag caatctctt agtagtcgc
 3121 ggcgcgcg cagcgtgtg tcttcggcg ggtcaatag ggaataatgt gtagacata
 3181 gogaactctt aaagtgctc atcatcgaa aagttcttc gggcgaaa cttccagga
 3241 tttacagcgt gttgagacc atgttgtgt aaacacatg tgaacttga gtttttga
 3301 catctttac ttccacagc gttctgtgt ggcgaacaa aggaagcaa aatgcgcga
 3361 aaagggatc aaggcgca cggaaaggtt gaactcct actctctt tctcaatt
 3421 atgaagcat ttatcaggt ttatgctca ttgagagta catatttga gtttttga
 3481 aaataaaca atagaggtt cgcgcacat ttccgaaa agtcacatc gactgttag
 3541 aaacatatt tatcatgca ttaactata aaataggg tacaaggg cctctgtgt
 3601 tgcgcgttt cgtgtatgc ggtgaaac tctcagcat gactcggg gagggtgca
 3661 cagatgtc gtagagcat gctgtgaga gacaagccc tggcggtg cagcggtgt
 3721 ttgggggtg tgggggtg ctttaactg agcatcaga ggaatttga ctga

【図 12】

FIG. 12.

pGN39

TAATAGACT CACTATAGG GAAATCAA AAAOCCCTCA AGACCCGTTT
 AGAGGCCCA AGGGGTATG CTATGATAT CTGCGCATG ACCCGGGAT
 CCTCTAGAG TCCCTGACC TOGAGATCA TTGTGCTGA AAGATACAA
 GTTTGTACA AAAAGCTGA GAGAAAGCT AAAATATAT AATATATAT
 ATATTAAT ATATTTTGA TAAAAAGAC ATACATATAT ACTGTAAAC
 ACACATATC CAGTCACTAT GGGGCGGCA TTAGGACCC CAGCTTATC
 ACTTATGCT TCCGCTGCT ATATGTGTG GATTTTGTG TAGAGTCCG
 CGAGATTTT AGAGATTAAG GAGCTTAAA TGGAGAAAT ATCACTGGA
 TATACACAG TTGATATAT CCAATGCGT GTAAAGAAC ATTTTGAAG
 ATTTGACCA GTTCTATAT GATCTATAA CCAAGCATG CAGCTGATTA
 TTACGCGCT TTAAAGAGC GTAAAGAAA ATAGACAAA GTTTTATCT
 GCTTATATC ACATCTTTC CCGCTGATG ATGCTGATG CAGCTGATG
 TATGCAATG AAGACGCTG AGCTGTGAT ATGAGATG CAGCTGCTG
 GTTACAGCT TTTCATGAG CAACGTAAA GTTTTATC CACTGTGAT
 GATATCCAG AGATTTTCG GCGTTTCTA CACATATAT CCAAGATG
 GCGTGTAT GGTAAAACG TGGCTATTT CCTTAAAGG TTTATGAGA
 ATATTTTCT GTTCTAGC AATCGCTGG TGGATTTCT CAGTTTGTG
 TTAAAGCTG CCAATATGA CAATCTTCT GCGCGGCTT TCAACATGG
 CMAATAT ATCAAGAGC ACAAGCTGT GATCGCGCT GAGCTGATG
 TTTATCATG CACTGTGAT GCTTCTAT TCGGCAAGT CTTAATGAA
 TTACACAGT ACTGATGAT GTGCGAGCG GGGGTAAA GATCTGATG
 CGCTTACTA AAGCCAGAT ACAGATATG GTATTGCG CGTGATTTT
 CGCTGTAG AATATATCT GATATGATA CCGAAGAT CCAAAAGA
 GGTGTCTAT GAGACAGCT ATTAGAGTA CAGTGTAC GAGACAGT
 CAGTCTCA ACATATAT GATGTATTA TCTTCTGT GATGATGAT
 ACATGAGA ATGAGCTGT AGGTGCGCT GTTTATGAA ATGACCT
 TAATCTGTA CAGAACAGC GATGTGAA ACAGATTTA AGTTTAC
 TTAATAGAG GAGACAGCT ATGCTGTG TGTGATTA CAGATGATA
 TATATGACG GCGGCGGGA CGATGTGTA TCCCTTGG CAGTGTGAT
 CTGCTGTAG ATAAAGTCT CCGTGAATC TACCGGTGG TCAATGCG
 GATGAAAG GAGGAGTGA TAGAACCGA TATGCGCT GTGCGGTCT
 CCGTATCG GAGAGAGAT GCTGATCTA GCAACGGA AATGACAT
 AAAAAAGCA TTAATGAT GTTCTGGGA ATATATGT CAGCTTCT
 TATACAGC CAGTGTGAG GTGAGCATA GATGATGAT ATGTTGTG
 TATGATAT ATGATGTCT TTTTATTTT AATATATAT TTAATATAT
 GATATTTAT TCAATTTAG TTTCTCTT ACCTTTCT TCAAGAGT
 TGATTTTTC AGCAAGAG ATCTGAGG ATCTTCTA CTACAGAT
 CTGCGCTTC AGTGTGCG CCGATCTTA AGGGTCTT TGAATCTT
 TACCTCTG GAGCTTATA AGGGTCTT TACTCTAT TCACTCTA
 GCGTATAG GATGTATTA AGGGTCTT TACTCTAT TCACTCTA
 ATAGCTTTC GATATATG TCACTCTA TACTCTAT TCACTCTA
 CCGTCTCA TTTCACTA CATACAGC GAGGATTA ATGTATAG

FIG. 12 (CONTINUED 1)

CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAACTGCG TTGGGCTCAC
 TGCCCGCTTT CCAAGTCGGA AACCTGTCTG GCGACGTGCA TTATGAAATC
 GGCCAACTCG GGGGAGAGG CGGTTTGGCT ATTGGGGCTC CTTCGCTTC
 CTGCGTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTGCT TGCGCTGCGG CGAGCGGTAT
 CAGCTCACTC TAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGAGGNTAAC
 CAGAGGAGAA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAGAAGCCA GGAACGTTAA
 AAAGGCGGCG TTGCTGGGCT TTCTTGATAG GCTTCGCCCC CTGACGAGCG
 ATCAAGAAAC TGACGCTGCA AGTCAGAGGT GCGGAAACCC GACAGGACTA
 TAAAGATACC AGGGTTTCT CCGTGTAA GCGCTGTGCT GCTTCTGCTG
 TCGAGACTCG CCGCTTAGCG GATACCTGTC GCGCTGTGCT CTTTCGAGAA
 GCGTGGGCTC TTCTCATAGC TGACGCTGTA GGTATCTCAG TTGCGGTGTA
 GTGTGTGCTC CCAGCTGGG CTGTGTGAC GAAACCCCGG TTGAGCGGGA
 CCGCTGCGCC TTATCGGTA ACTATGCTCT TGAGTCCAC CGGTGAGAC
 AGACTTATC GCGACTGCGA GAGCCCACTG GTACAGAGAT TAGCAGAGCG
 AGGTATGAG GCGGTGCTAC AGAGTCTCTG AAGTGTGCGC CTAACTAGCG
 CTACACTAGA AGACAGATAT TTGATATCTG GCGCTGTGCT AAGCGAGTTA
 CCTTCGAGAA AAGAGTTGCT AGCTCTGAT CCGGCAAAAC AACCAACGCT
 GGTAGCGGTG GTTTTTTTTG TTGCAAGCG CAGATTACCG GCGAAAAAAA
 AGAATCTCAA GAAGATCTTT TGATCTTTTC TGCGGGGCTC GAGCTCGAT
 GGAAGGAAAA CTCAGCTTAA GGGATTGTTG TCATGAGATT ATCAAAAAGG
 ATCTTCACTT AGATCTTTT AAATTAATAA TGAAGTTTAA AATCAATCTA
 AAGTATATAT GAGTAACCTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG
 AGCACCTAT CTAGCGATC TGCTTATTC GTTCATCTAT AGTTGCTGTA
 CTCGCGCTCG TGAGATATAC TAGCATACCG GAGGCGCTAC CATCTGCGCC
 CAGGCTGCA ATATATCCCG GAGACCCACG CTCACCGGCT CCGAGATTAT
 CAGCAATAA CCGGCGACCG GGAAGGCGCG AGCGCAAG TGCTCTGCA
 ACTTATCGCG CCGCATCACT GTCTATTAAT TGTCGCGCG AGCTGAGT
 AAGTAGTTCG CAGTATATA GTTGTGCGCA CGTGTGCGC ATTGCTACAG
 GCAATGTTGT GTACAGCTCG TGCTTGTGTA TGCGTCTCAT CAGTCTCGGT
 TCCCAACGAT CAGGCGAGTG TACATGATCC CCGATGTTGT GCAAAAAGCG
 GTTAGCTCC TTGCGTCTCT GAGTGTGTT CAGAGTAGAG TTGCGCGCAG
 TGTTACTACT CATGCTTATG CGAGCTCTGC ATATTTCTCT TACTGTGATC
 CACTCGTAA GATGCTTTTC TGAGCTGCT GAGTACTCAA CCAAGTCATT
 CTGAGATAC CGCGCGCGCG GACCGAGTTC CTCTTGCCCG GGTCTCATTAC
 GGAATAATAG TGATGACAT AGCAGAACTT TAAAGTGCT CATCATTTGA
 AACGCTTCT CGGGCGGAAA ACTCTCAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC
 CAGTTCGATG TAAACCCTCT GTGACCCCAA GTGATCTTCA GATCTTTTAA
 CTTCACCGG CGTTCCTGCG TGAGCAAAAC CAGGAAGGCA AAATGCGGCA
 AAAAAGGAAA TAAGGCGCAC ACGAAATGT TGAATATCTA TACTCTCTCT
 TTTTCAATAT TATTGAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT
 ACATATTGA ATGTATTGAG AAAATATAC AAATAGGGT TGCGGCGACA
 TTTCGCGAA AAGTGCGCA TGACGTGTA GAACATTA TTATCATAGC
 ATTAACCTAT AAAATAGCG GTATCAGAG CGCGTTCTGT CTGCGGCTGT
 TGCTGATGA CGGTGAACAC CTCTGACACA TGCGAGTCCG GAGAGCGTCT
 ACAGCTGTCT TGTAAGCGGA TGCGGCGAGC AGCAAGGCC GTACGCGGCG
 GTACAGGGGT GTTGGCGGCT GTGCGGCTCT GCTTAACTAT GCGCGATCAG

FIG. 12 (CONTINUED 2)

ACGAGATTCT ACTGAGAGTG CACCATATGC GTGTGAAAT ACCGACAGA
 TGCTTAGGA GAATATACCG CATCAGGCGA AATTGTAAAC GTTATATTT
 TGTTAAATAT CGCGTTAAAT ATTGTGTA TCGACTCAT TTTTACCAA
 TAGGCGGAA TGCGGAAAT CCCTTATA TCAAGAGAT AGACCGAAGT
 AGGTTGAGT GTTGTTCGAG TTGGAACAA GGTCTCATA TTAAGAGAG
 TGACTTCCA CGTCAAGGG GAAAAACCG TTATCAGGG GATGCGCCA
 CTAGCTGAC CATCACCCAA ATCAAGTTT TTGCGGTGTA GGTGCGGTA
 AGCTCTAAAT CGGAACCCCTA TAGGAGGCC CGGATTTAGA GCTTACGCG
 GAAAGCGCG GACCTGCGG AGAAGAGAG GAGAGAAAG GAAAGAGCG
 GCGCTAGGG CGCTGCGAG TTGAGCGGT CCGCTGCGCG TAACACACAC
 ACCGCGCGC CTAAATGCG CCGTACAGGG CGGCTCAT TCGCATTCAG
 GCTGCGAAC TGTTGGGAG GCGGATCGT GCGGCGCTCT TGCTATTAC
 GCGAGCTGCG GAAAGGGGGA TGCTGCGAA GCGGATTAAG TTGGGTAAAG
 CCAGGGTTTT CCGAGTCAG ACGTTGTAA ACGAGGCCA GTGAATTG

【図 13】

FIG. 13.

TopoRNAI
 61 gaggagacaa tatcggtgt gaaatcacgc acagatggtt aaggagaaa taacgcata
 62 gggcaaatgt taacagttaa tatattgtt aaattcogpt taattatttg ttaactcagc
 121 tcaatttttt accaatagg cgaatcggc aaaaatccct ataatcaaa agaataagac
 181 gagataggtt tgaggtgtgt tccagtttgg aacagagtc cactatataa gaaagtgagc
 241 tcaaacgtca aagggcgaaa aacgtgtatc caggcggtgt gccactacg tgaacactca
 301 cccaaatcaa gtttttggcg gtgcaggtgc cgtaaagctc taactggaa coctaaagg
 361 agcccccgat ttgaggtgtt acggggaaag ccggcgaaag tggcgagaa ggaagggag
 421 aagcgaaag gacggcggtc taggggtgtt gcaagtagt cgttcacogt ggoggttaac
 481 accaacoccg ccgctgttaa tgcgcgcta caggcgctgt ccatcgcca ttcaggtgc
 541 gcaactgttg ggaaggggca tgggtgggtt cctcttgcgt attagcgag cttggcgaa
 601 gggagtggtg tgcaggggca ttaattgttg taaagcgag gttttccag tctcgaagt
 661 gtaaaagcag gggcagtgaa ttgataacg actcaataa gggcgattc aaaaacccc
 721 tcaagacocg tttagagggc ccaaggggtt atgtagtag attctgag gtaacgggg
 781 atcctctagg gatcctcga cctcagagtc cctcgagctc ttgaacagc tgcggtaga
 841 tgggagocg aatacagtg taacgtcggt gttgggggtg cagcagcgg cggtttactg
 901 oggtctgag acacagaaac tggcgaaag gttgggggtg cagcagcgg cggtttactg
 961 gcaactcag aacagggcgg cgtcgtcga cgcactggcg gaaagcatcg tggcgagaa
 1021 tcatcagctt cgttcgagc agcgagcag gactggcgt cacttctgt cgggaahccc
 1081 gacgcaatgc tagcctgtgt agaatccaa cacaatgat ctagagggat cttcatacc
 1141 taccagttct ggcctcgag acggcgccg cgaactctca tccaaacaa catacagcg
 1201 taaacccctt gggcctcaa acgggtctgt aggggttt tgagctctc gccatagat
 1261 gaggctatt acagcttag tattctatg ttgctacaa atagcttgc gtaactatg
 1321 tcatagctgt ttcctgtgtt aaattgtat cgcgtcaaa tccaaacaa catacagcg
 1381 ggaagatata agtttaagc cttgggtgct taagtgatga gctaaactac attaatgag
 1441 ttgctctaac tggccgttt cagtgggga aacgtgtgt gccagtgca ttaagtact
 1501 ggcgaacgag cgggagagag cggtttggtt attggcgct cttccgttc ctcgctact
 1561 gactcgtcgt cgtggtgtt tgggttggc agcgaggtat cagctaaac aaaggggta
 1621 atagcgttat ccaagcagtc aggggatac gcaagaaaga acatgtgag aaagcgag
 1681 caaaagcgca ggaacgttaa aaagcgcg ttgctggct ttttgatag gctcgcgcc
 1741 cctgaagcgt atcaaaaaa tgcagctca agtcagaggt ggggaacccc gacagagcta
 1801 taaagataac agcgtttcc cctcgagag cctcctcgt tccgacctg tccgacctg
 1861 ccgattacag gatacctgc cgtcttctc ccttgggaa ggtgggctt tctcatag
 1921 tcaagctgta gttatctcag tctggttag gctgttgcgt colaagctg cttgtgacg
 1981 gaaacccccc ttaagcgga cgtcgtgct tttccggtt actatgct ttgagtaaac
 2041 cggtagaac acgattatc gccactggca cgaagcactg gtaacagat tagcagagc
 2101 aggtatgag cgggtgctac agagtcttg aagtggtgc ctaactcag ctacactaga
 2161 aggaagat ttgtatctg cgtctgtgtt aagcagta ctttgagaa aagagttgt
 2221 agcttctgat cgggcaaca aaccacggt ggtagcggtt gtttttgg ttcaagcag
 2281 cagattacg gaaagaaaaa agagttctca gaagatcct tgatctttc taagggtct
 2341 gacgtcagtt ggaagaaaa ctaagcttaa gggatttgg taagagatt atcaaaaa
 2401 atcttcaact agatcctttt aaattaataa tgaagttta aatcaatca aagtatat
 2461 gaggtaactt gttctgacag ttcaactgt ttaactggt aggaacatc ctaagcagc
 2521 tgtatcttc tgtatcact agttgctga ctcccggtg ttgagatac taagtaacg
 2581 gagggttaac catctggccc agatgctga atgatacgg gagaacocag ctacagagct
 2641 cagatttat cagcaataaa cagacgagc ggaagggcg agcgagaaag tggctcgtga
 2701 acttatctg cctcaaaa gttatctat ttgtgcgag aactagagt aagtagtctg
 2761 caggttaata gtttgccaa eyttgttgc attgtacag gcatgtgt ctacgctgt
 2821 tggtttggtt tggcttcat cagctcgggt tcccaagat caagcgagat tacatgctc
 2881 ccatgttgtt gcaaaaaag gtttagcttc tctcgctctc cgtatctgtt cagaagtag
 2941 ttggcgagag ttgtatcat catgtttag gaaagcttc ataatctct tactgtcag
 3001 ccatcgttaa gatgcttttc tggactggtt gaggtaacaa ccaagctat ctgagagta
 3061 cggcgccggt gacggaggtt cctctggcg gggcaaatc ggaataatg tctatgacat
 3121 agcgagat taaagtggt cactatgta aaagcttctt cggcgagaa actcacaag
 3181 atcttaocg ttgttagatc cagttcgat taaccoccaa ctgatcttca
 3241 gcatctttta ctttcaacag cgttttgggt tggagaaaaa caggagagca aagtgcgca
 3301 aaaaagggaa taagggcag acgaaggtt tgaataccta tactctctc ttttcaat
 3361 tattgaaga ttatcaggg ttatgtctc atgacggat acatattga atgtattag
 3421 aaaaataaac aatatgggtt tccggcgcaa tttcccgaa aagtgcacac tgaacttaa
 3481 gaaacatta ttatcagac attaacctat aaaaatggt gttacagag gccctttgt
 3541 ctggcggtt tgggtatga ggtgaasac ctatgacata tgaactcgc ggaaggtgc
 3601 acagctgttc tgaagcgga tgcgggagc agacaagccc gtaagggggt ctaaggggt
 3661 gttggcggtt gtcgggggtt gcttaactat ggggataag agcagattgt actga

【図 14】

FIG. 14.

TopoRNAI
 61 gaggagacaa tatcggtgt gaaatcacgc acagatggtt aaggagaaa taacgcata
 62 gggcaaatgt taacagttaa tatattgtt aaattcogpt taattatttg ttaactcagc
 121 tcaatttttt accaatagg cgaatcggc aaaaatccct ataatcaaa agaataagac
 181 gagataggtt tgaggtgtgt tccagtttgg aacagagtc cactatataa gaaagtgagc
 241 tcaaacgtca aagggcgaaa aacgtgtatc caggcggtgt gccactacg tgaacactca
 301 cccaaatcaa gtttttggcg gtgcaggtgc cgtaaagctc taactggaa coctaaagg
 361 agcccccgat ttgaggtgtt acggggaaag ccggcgaaag tggcgagaa ggaagggag
 421 aagcgaaag gacggcggtc taggggtgtt gcaagtagt cgttcacogt ggoggttaac
 481 accaacoccg ccgctgttaa tgcgcgcta caggcgctgt ccatcgcca ttcaggtgc
 541 gcaactgttg ggaaggggca tgggtgggtt cctcttgcgt attagcgag cttggcgaa
 601 gggagtggtg tgcaggggca ttaattgttg taaagcgag gttttccag tctcgaagt
 661 gtaaaagcag gggcagtgaa ttgataacg actcaataa gggcgattc aaaaacccc
 721 tcaagacocg tttagagggc ccaaggggtt atgtagtag attctgag gtaacgggg
 781 atcctctagg gatcctcga cctcagagtc cctcgagctc ttgaacagc tgcggtaga
 841 tgggagocg aatacagtg taacgtcggt gttgggggtg cagcagcgg cggtttactg
 901 oggtctgag acacagaaac tggcgaaag gttgggggtg cagcagcgg cggtttactg
 961 gcaactcag aacagggcgg cgtcgtcga cgcactggcg gaaagcatcg tggcgagaa
 1021 tcatcagctt cgttcgagc agcgagcag gactggcgt cacttctgt cgggaahccc
 1081 gacgcaatgc tagcctgtgt agaatccaa cacaatgat ctagagggat cttcatacc
 1141 taccagttct ggcctcgag acggcgccg cgaactctca tccaaacaa catacagcg
 1201 taaacccctt gggcctcaa acgggtctgt aggggttt tgagctctc gccatagat
 1261 gaggctatt acagcttag tattctatg ttgctacaa atagcttgc gtaactatg
 1321 tcatagctgt ttcctgtgtt aaattgtat cgcgtcaaa tccaaacaa catacagcg
 1381 ggaagatata agtttaagc cttgggtgct taagtgatga gctaaactac attaatgag
 1441 ttgctctaac tggccgttt cagtgggga aacgtgtgt gccagtgca ttaagtact
 1501 ggcgaacgag cgggagagag cggtttggtt attggcgct cttccgttc ctcgctact
 1561 gactcgtcgt cgtggtgtt tgggttggc agcgaggtat cagctaaac aaaggggta
 1621 atagcgttat ccaagcagtc aggggatac gcaagaaaga acatgtgag aaagcgag
 1681 caaaagcgca ggaacgttaa aaagcgcg ttgctggct ttttgatag gctcgcgcc
 1741 cctgaagcgt atcaaaaaa tgcagctca agtcagaggt ggggaacccc gacagagcta
 1801 taaagataac agcgtttcc cctcgagag cctcctcgt tccgacctg tccgacctg
 1861 ccgattacag gatacctgc cgtcttctc ccttgggaa ggtgggctt tctcatag
 1921 tcaagctgta gttatctcag tctggttag gctgttgcgt colaagctg cttgtgacg
 1981 gaaacccccc ttaagcgga cgtcgtgct tttccggtt actatgct ttgagtaaac
 2041 cggtagaac acgattatc gccactggca cgaagcactg gtaacagat tagcagagc
 2101 aggtatgag cgggtgctac agagtcttg aagtggtgc ctaactcag ctacactaga
 2161 aggaagat ttgtatctg cgtctgtgtt aagcagta ctttgagaa aagagttgt
 2221 agcttctgat cgggcaaca aaccacggt ggtagcggtt gtttttgg ttcaagcag
 2281 cagattacg gaaagaaaaa agagttctca gaagatcct tgatctttc taagggtct
 2341 gacgtcagtt ggaagaaaa ctaagcttaa gggatttgg taagagatt atcaaaaa
 2401 atcttcaact agatcctttt aaattaataa tgaagttta aatcaatca aagtatat
 2461 gaggtaactt gttctgacag ttcaactgt ttaactggt aggaacatc ctaagcagc
 2521 tgtatcttc tgtatcact agttgctga ctcccggtg ttgagatac taagtaacg
 2581 gagggttaac catctggccc agatgctga atgatacgg gagaacocag ctacagagct
 2641 cagatttat cagcaataaa cagacgagc ggaagggcg agcgagaaag tggctcgtga
 2701 acttatctg cctcaaaa gttatctat ttgtgcgag aactagagt aagtagtctg
 2761 caggttaata gtttgccaa eyttgttgc attgtacag gcatgtgt ctacgctgt
 2821 tggtttggtt tggcttcat cagctcgggt tcccaagat caagcgagat tacatgctc
 2881 ccatgttgtt gcaaaaaag gtttagcttc tctcgctctc cgtatctgtt cagaagtag
 2941 ttggcgagag ttgtatcat catgtttag gaaagcttc ataatctct tactgtcag
 3001 ccatcgttaa gatgcttttc tggactggtt gaggtaacaa ccaagctat ctgagagta
 3061 cggcgccggt gacggaggtt cctctggcg gggcaaatc ggaataatg tctatgacat
 3121 agcgagat taaagtggt cactatgta aaagcttctt cggcgagaa actcacaag
 3181 atcttaocg ttgttagatc cagttcgat taaccoccaa ctgatcttca
 3241 gcatctttta ctttcaacag cgttttgggt tggagaaaaa caggagagca aagtgcgca
 3301 aaaaagggaa taagggcag acgaaggtt tgaataccta tactctctc ttttcaat
 3361 tattgaaga ttatcaggg ttatgtctc atgacggat acatattga atgtattag
 3421 aaaaataaac aatatgggtt tccggcgcaa tttcccgaa aagtgcacac tgaacttaa
 3481 gaaacatta ttatcagac attaacctat aaaaatggt gttacagag gccctttgt
 3541 ctggcggtt tgggtatga ggtgaasac ctatgacata tgaactcgc ggaaggtgc
 3601 acagctgttc tgaagcgga tgcgggagc agacaagccc gtaagggggt ctaaggggt
 3661 gttggcggtt gtcgggggtt gcttaactat ggggataag agcagattgt actga

FIG. 14 (CONTINUED)

AAATCAATCT AAGGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG
CTTAATCACT GAGGACACTA TCTCAGGAGT CTGTCTATTT GTTCACTCCA
TAGTGTCCGT ACTCCCGCTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAAGGCTTA
CCATCTGGCG CAGTGTCTGC AATGATACCG CAGAGCCACG GCTCAGCGG
TCCAGATTTA TCAGCAATGA ACCAGCCACG CAGAGGCGCC GAGCGCAGAA
GTGTCTCTGC AACTTTATCC GCTCTCATCC AGTCTATTAA TTGTTCGCGG
GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTCGCGA ACGTTGTGTG
CATTTCTACA GGCATCTTGG TGTCAAGCTC GTGTGTGTGT ATGCTCTTAT
TCAGTCCCGT TTCCCAACGA TGAAGGCGAG TTGATGATC CCCATGTGTG
TGCAAAAGAG CGGTTAGCTC CTGTGTCTCT CGATCGGTG TCGAAGTAA
GTGTGCGGCA GTGTATCAC TCAGTGTATG GGCAGCACTG CATATCTCTC
TTACTGTCTAT GGCATCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGATCTACTA
ACCAAGTCTAT TCTGAGATA CCGGCGCCCG CAGACGAGTT GCTCTTGCCC
GGGTCAATA CCGGATAATA GTGTATGACA TAGCAGAACT TTAAGAGTGC
TCATCAATTG AAAAGCTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
CTGTGAGAT CCAAGTGTAT GTAACTCACT GTGCAACCA ACTGATCTTC
AGCATCTTTT ACTTTCACCA CGTGTCTTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC
AAATGCGCG AAAAAGGGA ATAGGGGCGA CAGGAAATG TTGAATACCT
ATACTCTTCT TTTTCAATA TTATGTGAAG ATTTATCAG GTTATGTCT
CATGAGCGA TACATATTG ATGTATTTPA GAAAAATAA CAAATAGGGG
TTCGCGCAC ATTTCCCGGA AAGTGTGAC CTGAGCTCTA AGAAACAT
ATTATCATGA CATTACCTA TAAAAATAGG CGATCACAGA GGCCTTTTGG
TCTGCGCGGT TTGCTGTATG ACGTSAAAA CTTCTGACAC ATGCACTTCC
CGAGACGCT CACAGCTTGT CTGTAGGCG ATCCCGGAG CAGACAGCC
CGTCAAGGCG CTGAGCGGG GTTGTGCGGG TGTGCGGCT GCTTAACTA
TGCAGCATCA GAGCAGATGT TACTGAGATG GCACATATATG CGTGTGAAA
TACGACACAG ATGCGTAAGG AGAAATAGC ACTCAGCGCG AATTTGTAAA
CGTTAATATT TTGTTAAAT TCGGTAAAT TAATGTTAA ATCAGCTCAT
TTTTTAACA ATAGCGGAA ATCGGCAAA TCCCTTATA ATCAAAAGAA
TAGACGAGAG TAGGCTTGG GTGTGTTCCA GTTGTGAAAC AGATCTCAT
ATTAAAGAAC GTGACTCCA ACGTCAAGG GCGAAAAACC GGTATACAGG
GCGATGGCC ACTAGCTGAA CACTCAACCA ATCAAGTTT TTTGCTCAGG
AGGTGCGGTA AAGCTCTAAA TCGGAGCTT AAGAGGAGCC CCGGATTAG
AGCTTGACG GGAAGCGCG CAGAGCTGCG GAGAAGGAA GGAAGAAAG
CGAAAGGAG GCGCGTAGG GCGCTGCGAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC
GTAAACACCA CACCGCGCG GCTTATGCG CCGCTACAGG GCGGTCTCAT
TCCGKATTCA GCGTGTGCAA GTTGTGGAAG GCGAAAGTGG TCGGGGCTC
TTGCTATTGA CCGCAGGCGG AGAAGGGGG ATGTGTGCGA AAGGATGAA
GTGTGGTAA GCGAGGCTT TCCAGTCA GCGTTGTAA AACAGCGGCG
AGTGAAT

FIG. 15 (CONTINUED)

CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCACTCG GTGTAGGTC TTGCTGCAA
GCTGCGCTGT GTGCAAGAAC CCGCGGTCTA CCGCGACCG TGCGCTTAT
CGGTAACTA TGTCTTGG TCGAACCGG TAAGACACGA CTATGSCCA
CTGCGACGAG CACTGGTAA CAGGATTAG AGAGCGAGT ATGTAGCGG
TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCTTAC TACGCGTAC ACTAGAAGA
CAGTATTGG TATCTGCGCT CTGCTGAGC CAGTATCTT CCGAAAAGA
GTGTGTAGT CTGTGTCGCG CAAACAAAC ACCGTGTGTA GCGTGTGTT
TTTGTGTC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA TCTCAAGAG
ATCCTTTGAT CTTTCTACG GGTCTGACG CTCAGTGGAA GGAACCTCA
CGTTAAGGGA TTTGTGCTAT GAGATTATCA AAAAGATCT TCACATGAT
CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAT ATATATGAT
AACTTGTCT TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCACTGAGGC ACCTATCTCA
GCGATCTGTC TATTTGCTTC ATCTAGATG GCTCTGACT CCGTGTGTA
GATAACTAG ATACGCGAG GCTTACATC TGGCGCCAGT GCTGCAATGA
TACGCGGAGA CCGACCTCA CCGGCTCCAG ATTATCAGC AATAAACAG
CGAGCGGAA GCGCGGCG CAGAAAGTGT CTGCAACTT TATCGCTCT
CAGTCACTCT ATATATGTT GCGCGGAGG TAGATTAAGT AGTTGCGCAG
TTAATAGTT GCGCAAGCT GTTGTGCTG CTACAGCTAT GTGTGTCTA
CCTCTGCTGT TGTGTAGCG TTCTATCAG TCCGCTTCC AAGCATAGG
GCGAGTTACA TGAJCCCCA TGTGTGCAA AAAAGCGTGT AGCTCTCTCG
GTCCTCCGAT GTTGTGAGA AGTAAAGTGG CCGCAGTGT ATCATCATG
GTTATGCGAG CACTGATAA TCTCTTACT GTCACTGCACT CCGTAAGATG
CTTTCTGTGT ACTGTGAGT ACTCAACCA GTCACTCTGA GAATACCGCG
CCCGCGACC GAGTGTCTCT TGGCGCGGT CAATACGGA TAATAGTGA
TGACATAGCA GAACCTTAAA AGTGTCTATC ATTGGAAGC GTTCTTCCGG
GCGAAAGCTC TCAAGATCT TACGCTGTGT GAGATCCAGT TCGATGTAA
CCACTGTGTC ACCCACTGA TCTTCAAGAT CTTTACTTTC CACAGCGT
TCTGCGTGG CAAAAACAG AGGCGAAAT GCGCAAAA AGGAATAAG
GCGACACAG AATGTTGAA TACTCATACT TCTCTTTT CAATATTAT
GAGCATTTA TCAGGTTAT TGTCTCATGA GCGATACAT ATTGAATGT
ATTTAGAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCG GCGCATTTCC CCGAAAAAG
GCCACTGAC GTTAAAGAA CCAATTATT CATGACATTA ACCATAAAA
ATAGGCGTAT CAGGAGGCC TTTCGTCTCG CGGTGTTGG TGATGACGT
GAAAACTCT GACATATGCA GCTCCGCGAG ACGTCTACAG CTTGTCTGTA
AGCGATGCG GAGGAGAGC AAGCGGTCTA GCGCGCTCA GCGGTTGTG
GCGGTTGTG GCGTGTGCTT AACTATGCG CATCAGACA GATTGTACTG

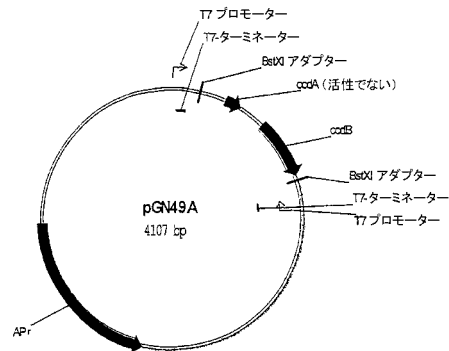
A

【図 15】

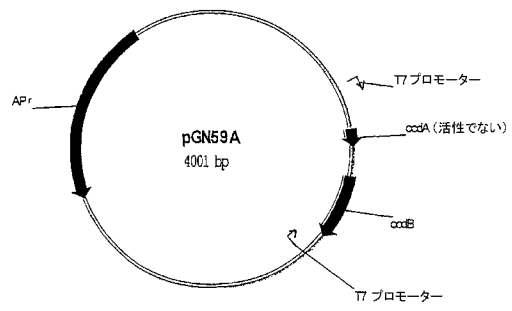
pGW384 FIG. 15.

GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAATACCCG ACAGATGCTT AAGGAGAAA
TACCGCATCA GCGAAATTTG TAAGCTTTAA TATTTGTTA AATTCGCT
TAAATATTGG TTAATCAGC TCATTTTTTA ACCAATAGG CAAATCGCG
AAATCCCTTT ATAAATCAA AGATAGACC GAGATGAGT TGAATGTTT
TCCAGTTTGG AACAGATGC CACTATTAAA GAGCTGTGAC TCCACGTCA
AAGGCGGAAA ACCCTGTAT CAGGCGGATG GCGCACTAC TGAACATCA
CCCAATCAA GTTTTTTGG GTGAGGTCG GTTAAGCTC TAAATCGGAA
CCCTAAGGG AGCCCCGAT TTAGAGCTTG ACGGGGAAA CCGCGAAGG
TGGCAGAAA GGAAGGAAAG AAGCGAAGG GAGCGGCGC TAGGCGCTG
GCAAGTGTAG CGTCACTGT GCGGTAAAC ACCACACCG CCGCGTTAA
TGCGCCCTA CAGGCGCGT CCACTGCGCA TCCAGCTGC GCACTGTG
GGAAGGCGA TCGGTGCGG CTTCTGCT ATTACCGAG CTGCGAAGG
GGGATGTGC TGAAGGCGA TTAAGTTGG TACCGCAGG GTTTCGAG
TCAAGATTT TGAAGACGAC GCGAGTGA TGTATATAG ACTCATATA
GGGCGAATTC GAGCTGTGTA CCGGGGATC CTCTAGAGT CCGTCACT
CGAGTCCAT TGTGCTGAA AGGATCTGA TCGGCTTAC TAAAGCGCAG
ATAACATAT GCGTATTGG GCGCTGATTT TCGGCTATA AGAATATATA
CTGATATGTA TACCGAAGT ATGTCAAAA GAGGTGTGCT ATGAGCAGC
GTATTAAGT GACGTTGAG ACCGAGCT ATCACTTCT CAGGATATAT
ATGATGTACA TACTCTCGGT CTGTAGACA CAGCATGCA GAAAGAGCC
CTCTCTGCT GTGCGAAGC CTGGAAGCG GAAATCAGG AAGGAGTGC
TAGAGTGGC CGTATTATG AATGAAGCG CTTCTTGTG GAGGAGAAC
GGAGTGTGT AATGCGATT TAGGTTTAC ACCATAAAA GAGAGAGCG
TTATGTCTG TTTGTGATG TACAGAGTGA TATTATTGAC AGCGCGGCG
GAGCGAGTGT GATCCCGCT GCGAGTGC GTCTCTAAG CGATAAGTC
TCCGTGAAC TTTACCGGT GTGCTATC GGGGATGAAA GCTGCGCAT
GATGACACC GATATGCGCA GTGTGCGGT CTCGTTATC GGGGAAGAG
TGTGTATCT CAGCAGCCG GAAATGACA TCAAAAAGC CATTAACTCT
ATGTTCTGG GAAATATAAT GTGAGCTCC CTTATACAG GCTTTCTCG
CAGATGATGT CTGAGGAGT CTTCAATCC TACCATTTCT GCGCTGCGAG
GTGCGCGCG CAGCTCTCTA GAGTGAAG CTTCTGCGC TATAGTAGT
CGTATTACAG CTTGAGTAT CTATAGTGT ACCATAATAG CTTGCGTAA
TATGTTTAT AGCTGTTCC TGTGTGAA TGTATTCG TCAAAATTC
ACACACATA CAGCGCGGA GCGTAAGTGT TAAAGCTTGG GTGCGTAA
GAGTGAATCA ACTCACTTA ATGCTGTTC GCTCACTGCC CCGTTTCCG
TCCGGAAGC GTGCGTCC CACTGATTA TGAATGCGC AAGCGCGCG
GAGAGCGGT GTGCGTATG GCGCTCTCT CCGTCTCTCT CTCACTGAT
CGCTGCTCT GCTGCTGCG CTGCGCGAG CGTATCAG TCACTAAG
GCGGTATAC GTTTATCCAC AGATCAGG GATAAGCG GAAAGACAT
GTAGGCAAAA GCGCAGAA AGCGAGAA CGTAAAGG GTCGCTTGC
TGGCGTTTT CAGTAGCTC GCGCGCGCT ACGAGCATCA CAAATCGA
CGCTCAAGT AGAGGTGCG AAGCGCGCA GAGTATAA GATACCGAGC
GTTTCCCGCT GAGAGCTTCC TGTGCGCTC TCTGTCTCG ACCCTGCGC
TTACCGGATA CCGTCTCGC TTTCTGCTT CCGGAGAGGT GCGCTTCT

【図 16】



【図 17】



フロントページの続き

(74)代理人 100139000

弁理士 城戸 博兒

(74)代理人 100152191

弁理士 池田 正人

(72)発明者 プレターンク, ギアー

ベルギー, ベー - 9 8 2 0 メルビーック, ポンストラート 1 6

(72)発明者 レナード, ジャン - ピエール

ベルギー, ベー - 9 0 5 0 ゲンブルゲ, ピーター ベノートラン 1 4 1

(72)発明者 ボガート, ティエリー

ベルギー, ベー - 8 5 0 0 コルトレイク, ウォルヴァンドリーフ 2 6 ゲー

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 0 9 7 4 7 (WO, A 1)

国際公開第 0 0 / 0 0 1 8 4 6 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed